

Санкт-Петербургский государственный университет

ФЕДОТОВА Евгения Александровна

Выпускная квалификационная работа

***Микро- и наночастицы на основе алифатических сложных полиэфиров для доставки
противоопухолевых препаратов***

Уровень образования: магистратура

Направление *04.04.01 «Химия»*

Основная образовательная программа *ВМ.5512.2018 «Химия»*

Научный руководитель: с.н.с.,
Межкафедральная лаборатория
биомедицинской химии Института
Химии СПбГУ, к.х.н., СИНИЦЫНА
ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

Рецензент: с.н.с., Лаборатория
полимерных сорбентов и носителей
для биотехнологии Института
Высокомолекулярных Соединений
Российской Академии Наук, к.х.н.,
ШЕВЧЕНКО НАТАЛЬЯ
НИКОЛАЕВНА

Санкт-Петербург
2020

Содержание

Перечень условных обозначений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Системы доставки лекарств на основе полимерных частиц.....	8
1.1.1 Типы полимерных частиц.....	11
1.1.2 Размер и потенциал полимерных частиц.....	11
1.1.3. Факторы, влияющие на скорость высвобождения лекарств.....	12
1.2. Биоразлагаемые полимеры для получения микро- и наночастиц.....	14
1.2.1 Поли(молочная кислота).....	16
1.2.2. Синтез поли(молочной кислоты).....	17
1.2.3 Свойства ПМК.....	20
1.2.4. Системы доставки лекарств на основе полимерных частиц из ПМК.....	21
1.2.5. Поли(ε-капролактон).....	21
1.2.6. Получение поли(капролактона).....	22
1.2.7. Системы доставки лекарств на основе частиц из ПКЛ.....	23
1.2.8. Поли(этиленгликоль).....	24
1.3. Получение полимерных частиц.....	26
1.3.1. Эмульсионные методы на основе испарения растворителя.....	27
1.3.1.1. Механизм процесса.....	28
1.3.1.2. Стабилизация эмульсии.....	29
1.3.1.3. Ультразвуковая гомогенизация.....	30
1.3.1.4. Контроль размера микрочастиц.....	31
1.3.1.5. Влияние концентрации ПАВ на распределение частиц по размерам.....	31
1.3.1.6. Влияние концентраций полимера и ПАВ.....	32
1.3.1.7. Влияние молекулярной массы полимера.....	33
1.3.1.8. Влияние количества лекарственного средства на размер частиц.....	34
1.3.2. Метод nanoосаждения.....	34
1.3.2.1. Узо-эффект.....	35
1.3.2.2. Механизм формирования частиц.....	37
1.3.2.3. Стабилизация наночастиц.....	38
1.3.2.4. Влияние молекулярной массы полимера на размер частиц.....	39

1.3.2.5. Влияние концентрации полимера.....	40
1.3.2.6. Влияние растворителя.....	41
1.3.2.7. Влияние скорости ввода и перемешивания.....	42
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	43
2.1. Материалы.....	43
2.2. Оборудование.....	44
2.3. Методы.....	44
2.3.1. Синтез сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК и гомополимера ПМК.....	45
2.3.2. Синтез сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ и гомополимера ПКЛ.....	46
2.3.3. Методы исследования полимеров.....	46
2.3.4. Получение инкапсулированных наночастиц на основе гомополимеров ПМК, ПКЛ и сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ методом наноосаждения.....	47
2.3.5. Получение инкапсулированных микрочастиц на основе гомополимеров ПМК, ПКЛ и сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ методом одинарной микроэмульсии (масло-в-воде).....	48
2.3.6. Количественный анализ инкапсулированного препарата.....	48
2.3.7. Исследование характеристик полимерных частиц.....	49
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	50
3.1. Синтез гомополимера ПМК и блок-сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК.....	50
3.2. Синтез гомополимера ПКЛ и блок-сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ.....	55
3.3. Характеристики полимерных частиц.....	59
3.4. Характеристики инкапсулированных полимерных частиц, полученных методом наноосаждения.....	66
3.5. Характеристики полимерных микрочастиц.....	70
3.5. Эффективность инкапсулирования диоксидэтилена в частицы, полученные методом наноосаждения.....	77
3.6. Эффективность инкапсулирования диоксидэтилена в контейнеры, полученные методом одинарной эмульсии.....	80
ВЫВОДЫ.....	85
БЛАГОДАРНОСТИ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	87

Перечень условных обозначений

АТЧ — анализ траектории частиц

ГПХ — гель-проникающая хроматография

ДРС — динамическое рассеяние света

НЧ — наночастицы

О.Э — одинарная эмульсия

ПАВ — поверхностно-активные вещества

ПВС — поливиниловый спирт

ПКЛ — поли(капролактон)

ПЛГА — поли(молочная кислота-*co*-гликолид)

ПМК — поли(молочная кислота)

ПЧ — полимерные частицы

ПЭГ-5000 — метиловый эфир поли(этиленгликоля)-5000

ПЭГ-5000-*b*-ПКЛ — блок-сополимер поли(этиленгликоля) с поли(капролактоном)

ПЭГ-5000-*b*-ПМК — блок-сополимер поли(этиленгликоля) с поли(молочной кислотой)

ТГФ — тетрагидрофуран

ЭИ — эффективность инкапсулирования

ROP (Ring-opening polymerization) – полимеризация с раскрытием цикла

SDS (Sodium lauryl sulphate) – лаурилсульфат натрия

PdI (Polydispersity index) – индекс полидисперсности

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних двух десятилетий наблюдается значительный интерес к разработке микро- и наночастиц как перспективных систем для доставки лекарственных веществ. Такие системы могут увеличивать биодоступность, растворимость и проницаемость многих сильнодействующих гидрофобных препаратов [1]. Способность контролируемо высвобождать фармакологически активные агенты в органах или тканях, в которых непосредственно необходимо проводить терапию, при оптимальных скоростях и концентрациях вызывает интерес к таким разработкам во многих областях медицины. Особое внимание привлечено к терапии онкологических заболеваний, где состояние пациента определяется не только успешным разрушением раковых клеток, но и способностью здоровых органов и клеток преодолеть токсичность системной химиотерапии. Системная внутривенная химиотерапия предполагает применение высоких доз цитостатических препаратов. При использовании данного подхода лекарство доставляется системой кровоснабжения как в опухолевые ткани, где оказывает свое прогнозируемое и непосредственное действие и дезактивирует патологический очаг, однако при этом большая часть препарата взаимодействует со здоровыми клетками. Поэтому, достаточно часто после нескольких курсов традиционной химиотерапии пациенты сталкиваются с побочными действиями цитостатиков, приводящими к отказу работы почек и печени. Разработка новых подходов к лечению онкологических заболеваний является актуальной и социально значимой задачей. Одной из лидирующих онкологических патологий (имея в виду высокий уровень заболеваемости и низкий уровень выживаемости) является рак яичников. В качестве альтернативного подхода для проведения химиотерапии при раке яичников предлагается возможность внутрибрюшинного введения полимерных частиц с инкапсулированным цитостатическим препаратом, так называемая интраперитонеальная химиотерапия. Аргументами для назначения локальной химиотерапии является меньшая токсичность для организма при сравнении с системной химиотерапией, проводимой внутривенно,

а также характерная особенность рака яичников метастазировать по поверхности брюшины в пределах брюшной полости

Действуя в качестве контейнеров для цитостатического препарата, частицы защищают его от преждевременной дезактивации и контакта со здоровыми клетками, а также продлевают период его выведения из организма [2]. Контролируемое и пролонгированное высвобождение лекарства из частиц при оптимальной скорости и режиме дозирования позволяет: увеличивать локальную концентрацию цитостатика в раковых клетках и устранять необходимость в повторном вводе препарата. Контейнеры в условиях осуществления локальной химиотерапии являются источником для непрерывной подачи лекарства в непосредственной близости от патологического очага, что дает возможность увеличивать эффективность терапии и уменьшить побочные эффекты [3].

В настоящее время в качестве систем доставки лекарств, наибольший интерес вызывают частицы на основе биоразлагаемых полимеров, такие как полимерные сферы, мицеллы и полимеросомы. В качестве биоразлагаемых носителей для получения таких частиц наибольшей перспективностью обладают синтетические амфифильные сополимеры алифатических полиэфиров, таких как поли(молочная кислота) или поли(капролактон) с гидрофильными полимерами. Системы доставки лекарств на основе амфифильных сополимеров характеризуются высокой стабильностью в кровяном русле, биосовместимостью с органами и тканями, а также способностью разлагаться с образованием нетоксичных для организма продуктов. Также использование синтетических биоразлагаемых полимеров в качестве основы для частиц позволяет контролировать физико-химические свойства контейнеров, такие как: размер, свойства поверхности и скорость разложения полимерных носителей. Вариация природы полимера и его молекулярно-массовых характеристик дает возможность контроля скорости высвобождения лекарственных веществ.

Таким образом, **целью данного исследования является:** получение микро- и наночастиц на основе амфифильных блок-сополимеров поли(этиленгликоля) с молекулярной массой 5000 (ПЭГ-5000) с поли(молочной кислотой) ПЭГ-5000-б-ПМК

и поликапролактоном ПЭГ-5000-б-ПКЛ, способных эффективно инкапсулировать и контролируемо высвобождать противоопухолевые препараты, а также сравнение полученных контейнеров с носителями на основе гомополимеров ПМК и ПКЛ, являющихся широко зарекомендованными себя стандартами в области биомедицины. В рамках данного исследования будет использован новый противоопухолевый препарат из группы алкилирующих соединений этилениминов — диоксадэт.

Достижение поставленной цели определило следующие **задачи**:

- получение амфифильных блок-сополимеров поли(капролактона) и поли(молочной кислоты) с метиловым эфиром поли(этиленгликоля) и их гомополимеров с различными молекулярными массами;
- анализ состава и молекулярно-массовых характеристик синтезированных полимеров с использованием методов ЯМР-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии;
- разработка метода инкапсулирования лекарственного вещества - диоксадэта в полимерные контейнеры на основе алифатических сложных полиэфиров и получение микро- и наночастиц с заданными размерами методами одинарной эмульсии и наноосаждения;
- определение размера и дзета-потенциала полученных частиц с использованием методов динамического рассеяния света и анализа траектории частиц;
- изучение эффективности инкапсулирования и максимальной загрузки противоопухолевого препарата в частицы в зависимости от природы и молекулярной массы полимера, а также метода получения полимерных носителей.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Системы доставки лекарств на основе полимерных частиц

В настоящее время большой интерес в области биомедицины вызывают системы доставки лекарств. Данные системы способны увеличивать биодоступность многих препаратов, продлевать период их полувыведения из кровотока, а также обеспечивать постоянную концентрацию лекарственных средств без многократного введения, что повышает эффективность проводимой терапии.

На сегодняшний день известно большое количество носителей, которые могут быть использованы в качестве систем доставки лекарственных средств. Часть из них представлена на рис. 1.. Это могут быть системы на основе неорганических частиц: золота, никеля и железа, кремнеземов, а также на основе наноалмазов, фуллеренов и фуллеренолов.

Также известны частицы на основе полимерных компонентов: липосомы, полимеросомы, полимерные микро- и наносферы, дендримеры, мицеллы, наногели.

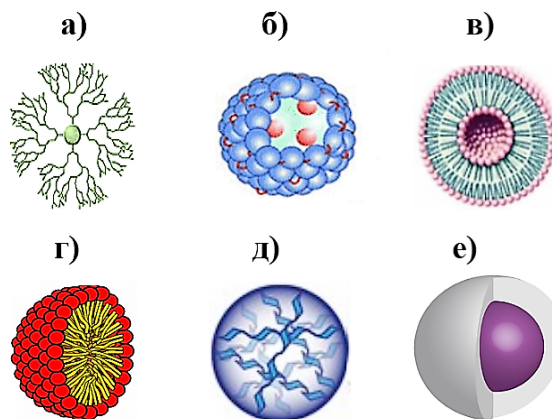


Рисунок 1. Схематическое изображение систем доставки лекарств на основе частиц: (а) дендримеры, (б) наногели, (в) липосомы, (г) мицеллы, (д) полимерные частицы, (е) полимеросомы.

В настоящее время достаточно активно проводятся исследования для разработки систем доставки лекарств на основе липосом и неорганических наночастиц. Липосомы представляют собой полые частицы, содержимое которых ограничено липидной мембраной, и относятся к семейству везикулярных структур, образуемых амфифильными молекулами. Такие контейнеры могут захватывать как гидрофобные, так и гидрофильные соединения и защищать инкапсулированные соединения от внешней среды. Захваченный препарат способен избирательно накапливаться в пораженном участке за счет пассивного или активного транспорта. Пассивный транспорт обеспечивается взаимодействием липосом с анатомическими структурами сосудов ткани-мишени благодаря своим физико-химическим свойствам и, тем самым, обеспечивает селективное накопление веществ. Для активного транспорта поверхность липосом модифицируется направляющим вектором, которым может быть антитело или лиганд рецептора, позволяющим распознать целевые клетки на молекулярном уровне и затем связываться с ними. Далее липосомы интернализуются клетками-мишенями или разрушаются различными способами (ферментативный гидролиз или воздействие извне: ультразвуком или температурой) возле поверхности клеток с последующим высвобождением препарата и его захватом этими клетками [4]. Системы доставки на основе липосом обладают высокой биосовместимостью. На данный момент существует ряд коммерчески доступных липосомальных лекарственных форм, в том числе, для терапии некоторых видов рака. Несмотря на достоинства подобных систем, к их существенным недостаткам можно отнести нестабильность в кровяном русле. К дополнительным ограничениям относится то, что липосомы демонстрируют плохую коллоидную стабильность в состоянии суспензии [5].

Также большое количество работ посвящено наночастицам, полученным из неразлагаемых материалов, таких как золото, диоксид кремния или оксиды металлов. Использование таких частиц дает возможность разрабатывать носители с более широким диапазоном размеров и вариации поверхностных свойств, чем биоразлагаемые частицы, но данные носители имеют меньший потенциал в качестве платформ для систем доставки лекарств из-за более высокого риска длительного накопления в тканях, что может привести к токсическим эффектам. Также

лекарственное вещество в таких системах находится на поверхности частиц-носителей и может контактировать с окружающим биологическим пространством, и следовательно, оказывать неспецифическое воздействие [6].

Таким образом, всё больший интерес вызывают биоразлагаемые полимерные нано- и микрочастицы в качестве систем доставки лекарств. Такие частицы обеспечивают контролируемое высвобождение инкапсулированного лекарства, субклеточный размер и биосовместимость с тканями и клетками. Кроме того, они стабильны в кровяном русле, нетоксичны, разлагаются с образованием безопасных для организма метаболитов и используются для инкапсулирования различных молекул, таких как лекарственные средства, белки, пептиды и нуклеиновые кислоты [7].

Находясь в непосредственной близости от патологического очага, полимерные частицы могут поглощаться опухолевыми клетками путем неспецифического эндоцитоза, который быстро увеличивает внутриклеточную концентрацию лекарственного средства, что приводит к максимальному фармакологическому эффекту. После накопления в тканях полимерные контейнеры высвобождают инкапсулированное лекарство посредством диффузии и биodeградации полимерной матрицы. Показано, что частицы на основе биоразлагаемых полимеров сами по себе не токсичны для клеток [8].

1.1.1 Типы полимерных частиц

Для систем доставки лекарств чаще всего используют полимерные частицы нано- и микро размеров в связи с их высокой степенью проницаемости и безопасности для органов и тканей.

Микро- и наночастицы определяются как сферические коллоидные частицы матричного типа, имеющие небольшой размер и большую площадь поверхности. Размер наночастиц обычно варьируется от 10 до 300 нм. Размер микро частиц лежит в диапазоне от 0,1 до 100 мкм [5]. В зависимости от способа приготовления могут быть получены полимерные (нано/микро)сферы или (нано/микро)капсулы (рис. 1.). Лекарственное средство в таких системах может быть растворено, инкапсулировано

или прикреплено к матрице полимерных частиц. Полимерные сферы представляют собой сплошные матричные системы доставки лекарств в виде частиц субмикронного размера, в которых лекарственное средство равномерно диспергировано внутри полимерной матрицы. В отличие от полимерных сфер, полимерные капсулы (полимеросомы) представляют собой везикулярные системы, в которых лекарственное средство ограничено водной или масляной полостью, окруженной полимерной мембраной. Таким образом, нанокapsулы можно рассматривать как «резервуарную» систему, в которой лекарство инкапсулировано внутри полимерной частицы [9]. В случае полимеросом ядро лекарства покрыто полимером, и высвобождение происходит путем диффузии лекарства из ядра через полимерный барьерный слой. Следовательно, возможен контроль скорости высвобождения лекарственного средства, путем изменения состава и толщины стенки контейнера.

1.1.2 Размер и потенциал полимерных частиц

Размер, величина ширины распределения (Pdl) и поверхностный заряд полимерных носителей являются критическими параметрами, которые существенно влияют на клеточное поглощение, взаимодействие с биологическими мембранами и белками плазмы, на время циркуляции в кровотоке, биораспределение, а также на физическую стабильность частиц [10].

Анализ данных, представленных в литературе, показал, что нижний предел допустимого размера частиц составляет 5,5 нм, объекты с такими размерами удаляются из организма путем почечной фильтрации. Второй нижний предел налагается фильтрацией печени и составляют 50–100 нм. Частицы размером менее 50 нм будут взаимодействовать с гепатоцитами и быстро выводиться из организма. На верхний же предел размера частиц влияет проницаемость сосудов (до нескольких десятков мкм). Также показано, что полимерные частицы с размерами более 500 нм быстрее обнаруживаются макрофагами и выводятся из организма. Наночастицы в целом имеют относительно более высокое внутриклеточное поглощение по сравнению с микрочастицами. Результаты, представленные в исследованиях [11,12], подтвердили, что наноконтейнеры размером 100 нм демонстрировали в 2,5 раза

большее поглощение по сравнению с 1 мкм и в 6 раз более высокое поглощение по сравнению с 10 мкм микрочастицами. Анализ данных для систем доставки лекарств на основе липосом показал, что количество контейнеров с размерами в диапазоне от 100 до 200 нм было в 4 раза выше в раковых клетках по сравнению с числом липосом с размерами ниже 50 и выше 300 нм [1,11]. Таким образом, оптимальный размер систем доставки лекарств для применения в онкологии варьируется от 100 до 300 нм. Этот размер достаточно велик, чтобы предотвратить фильтрацию почками, достаточно мал, чтобы избежать захвата макрофагами, и способствует накоплению в областях пораженной сосудистой системы [12].

Дзета-потенциал (ξ -потенциал) описывает общий заряд на поверхности частиц и является мерой стабильности коллоидной системы, обеспечиваемой электростатической стабилизацией. Понятие дзета-потенциала появляется в следствие того, что существует разность потенциалов между объемом раствора и поверхностью частиц. Значения ξ -потенциала могут быть положительными, нейтральными или отрицательными в зависимости от природы полимера [2]. Электростатическое отталкивание между частицами с высокими абсолютными значениями ξ -потенциала (от 15 мВ) предотвращает их агрегацию и тем самым обеспечивает высокую стабильность дисперсии частиц [13].

1.1.3. Факторы, влияющие на скорость высвобождения лекарств

Контролируемое высвобождение лекарств из полимерных носителей достигается путем управления физическими и химическими свойствами полимера и частиц. Такие вопросы, как молекулярная масса, состав и кристалличность полимера, свойства лекарственного средства, пористость и размер частиц, влияют на профиль высвобождения и могут быть адаптированы к желаемому результату [11]. Лекарственное средство, заключенное в медленно разлагающуюся матрицу, обеспечивает возможность более медленного высвобождения, но разложение полимера не является единственным механизмом высвобождения лекарственного средства. Высвобождение лекарственного средства также контролируется диффузией,

поскольку лекарство может проходить через поры, образующиеся во время формирования частиц [12,13].

Во многих случаях профили высвобождения являются довольно сложными и часто демонстрируют две основные стадии выпуска: первый - это первоначальный выброс лекарственного средства с поверхности частиц; на второй происходит высвобождение лекарства из полимерного контейнера, скорость которого зависит от диффузии и деградации [13].

Высвобождение лекарственного средства из полимерных частиц обычно проходит в 3 фазы с периодами всплеска, покоя и, наконец, медленного и непрерывного высвобождения. Взрывное высвобождение происходит до любой значительной деградации полимера и, как правило, наблюдается в течение первых нескольких часов или нескольких дней. Взрывное высвобождение связывают с лекарственным средством, адсорбированным на поверхности частицы. В течение периода покоя, характеризующегося практически полным отсутствием биологического высвобождения, разложение полимера происходит по всей частице до тех пор, пока не сформировалась достаточная сеть поровых каналов, обеспечивающая медленное и непрерывное выделение биологического вещества. В некоторых системах период покоя незначителен либо потому, что сеть пор уже существует, либо потому, что используется быстро разлагающийся полимер. За периодом покоя следует медленное высвобождение лекарственного вещества с нулевой кинетикой или кинетикой высвобождения первого порядка [13,14]

Механизм высвобождения может контролироваться молекулярной массой используемого полимера, так как деградация полимерных частиц показывает четкую зависимость от молекулярной массы полимера. Чем выше молекулярная масса, тем медленнее будет проходить процесс деградации, и медленнее будет высвобождаться лекарство.

В одном из исследований был изучен профиль высвобождения лекарственного средства в зависимости от молекулярной массы полимера поли(молочная кислота-со-гликолид). Было продемонстрировано, что при более низких массах (19000) был получен относительно постоянный профиль высвобождения; увеличение молекулярной массы до 23000, 44000 и 74000 уменьшило линейность высвобождения

[14]. Скорость высвобождения лекарственного средства из частиц, содержащих полимеры с более высокой молекулярной массой, первоначально была высокой, за которой последовало снижение, за которым снова последовало увеличение. Двухступенчатый профиль высвобождения предполагает наличие двух доминирующих механизмов высвобождения в полимерах с высокой молекулярной массой: сначала частицы подвергаются начальному медленному высвобождению лекарства из-за диффузии лекарственного средства, а далее следует высвобождение из-за разложения полимерной матрицы. В то время как для полимеров с низкой молекулярной массой деградация является основным механизмом высвобождения [13]. Посредством этих переменных скорости деградации полимерных частиц могут быть настроены в диапазоне от дней до месяцев.

Высвобождение лекарства также зависит от природы полимерной матрицы, влияющей на эффективность загрузки лекарства. Емкость загрузки лекарственного средства прямо пропорциональна скорости выброса и высвобождения инкапсулированного лекарственного средства [15].

1.2. Биоразлагаемые полимеры для получения микро- и наночастиц

Для формирования биоразлагаемых частиц могут быть использованы как синтетических, так и природные полимеры (рис. 2). Среди синтетических полимеров чаще всего используются: полимолочная кислота, полигликолид, поликапролактон и их сополимеры. Среди природных полимеров выделяют: желатин, декстран и хитозан [2].

Системы доставки лекарств, изготовленные из синтетических полимеров, привлекают всё большее внимание в связи с их более высокой стабильностью и возможностью контроля физико-химических свойств путем изменения природы и состава полимера, что является важным преимуществом по сравнению с носителями на основе природных полимеров, так как физико-химические свойства полимерных носителей, такие как размер, морфология, химический состав и заряд поверхности влияют на фармакокинетику, биораспределение и селективность проникновения лекарственного средства в опухолевые клетки [16]. Также частицы на основе

синтетических полимеров поддерживают высвобождение инкапсулированного терапевтического агента в течение периода от нескольких дней до нескольких недель по сравнению с природными полимерами, которые имеют относительно короткую продолжительность высвобождения лекарственного средства [9,17].

Среди большого количества биоразлагаемых полимеров, доступных для получения полимерных наночастиц, наиболее часто используемые относятся к семейству сложных полиэфиров, такие как поли(молочная кислота) (ПМК) [16] и поли(капролактон) (ПКЛ) [6,8]. Известно, что эти полимеры проявляют превосходную биосовместимость и подвергаются гидролизу в организме, образуя биологически совместимые и метаболизируемые фрагменты.

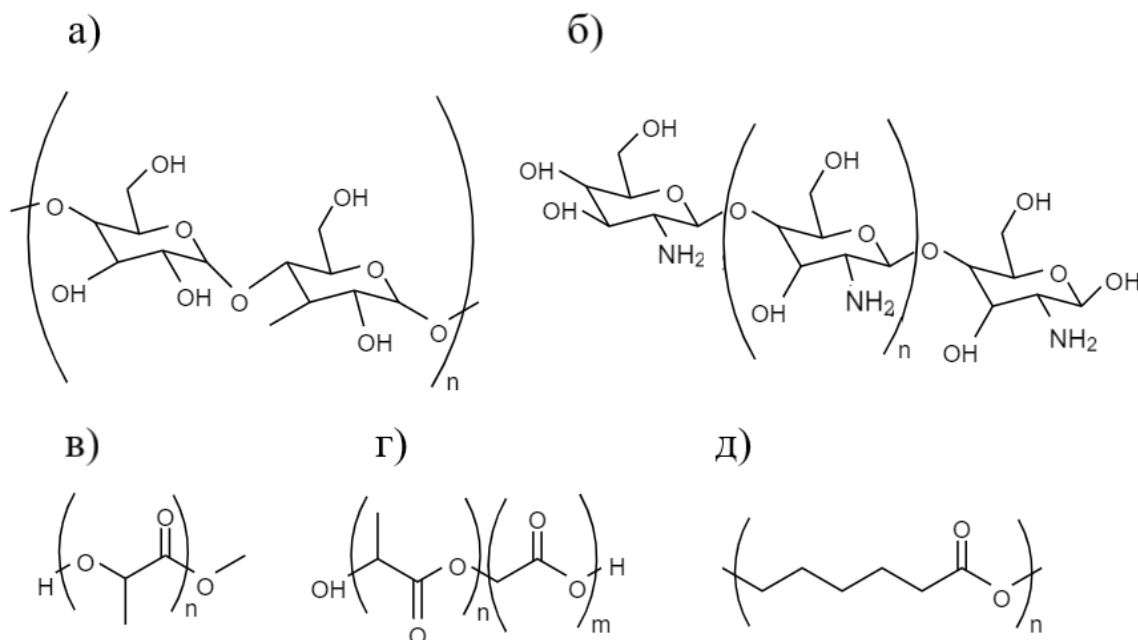


Рисунок 2. Биоразлагаемые полимеры, используемые в качестве матриц для систем доставки лекарств. Природные полимеры: (а) декстран, (б) хитозан. Синтетические: (в) поли(молочная кислота), (г) поли(молочная кислота-со-гликолид), (д) поли(капролактон) [12].

Данные полимеры были проверены на токсичность и безопасность в ходе обширных исследований и в настоящее время используются в качестве основы для создания хирургических нитей, костных имплантатов и винтов, а также для конструирования опорных скаффолдов в исследованиях тканевой инженерии [18].

Отдельный интерес вызывают частицы, полученные из амфифильных сополимеров, таких как поли(молочная кислота) - поли(этиленгликоль) (ПМК-ПЭГ) или поли(капролактон) - поли(этиленгликоль) (ПКЛ-ПЭГ). Такие носители характеризуются архитектурой “ядро-оболочка”, в которой гидрофобное ядро окружено цепями гидрофильного полимера. Такие системы способны эффективно инкапсулировать внутрь ядра нерастворимые в воде малые молекулы, повышая их биодоступность и локальную концентрацию в водных средах [1], в то время как слой ПЭГ обеспечивает стабильность частиц и увеличение продолжительности пребывания контейнеров в организме. Частицы, модифицированные поли(этиленгликолем) или другими гидрофильными полимерами, становятся практически невидимыми для макрофагов, которые отвечают за выведение частиц из кровотока, что повышает длительность циркуляции систем доставки [19]. В качестве гидрофильных носителей используют ПЭГ, катионные полимеры, такие как поли(этиленмин), поли(4-винилпиридин), поли(лизин), поли(*N*-метилдиэтинаминсакат), хитозан, или полиэлектролиты, такие как поли(аспарагиновая кислота) [20].

1.2.1 Поли(молочная кислота)

На сегодняшний день поли(молочная кислота) (ПМК) является одним из наиболее часто используемых биоразлагаемых полимеров в области биомедицинских применений. ПМК представляет собой биосовместимый гидрофобный алифатический полиэфир, который подвергается расщеплению в организме до мономерных звеньев молочной кислоты. Метаболиты ПМК могут быть использованы организмом в качестве естественного промежуточного звена в метаболизме углеводов [1].

В качестве мономера при производстве ПМК применяется молочная кислота. Молочная кислота (2-гидроксипропионовая кислота), представляет собой простую α -гидроксикислоту, которая содержит хиральный атом углерода и существует в виде двух энантиомерных форм: L- и D-молочная кислота. Оптически неактивная D,L-мезоформа представляет собой рацемическую смесь D(-) и L(+) изомеров [21]. Поскольку мономер имеет два стереоизомера, ПМК может быть синтезирована в виде

поли(L-молочной кислоты), поли(D-молочной кислоты) или в виде рацемических продуктов и поли (D,L-молочной кислоты).

Процессы переработки, кристаллизации и разложения ПМК зависят от структуры и состава полимерных цепей, в частности, от соотношения L- и D-изомеров в составе полимера. Изотактические, оптически активные и кристаллические гомополимеры получают, если димеры L- или D-лактида полимеризуются отдельно. Однако D,L-лактид или сополимеры L- и D-димеров полимеризуются с получением атактических, неактивных оптически и аморфных полимеров [22].

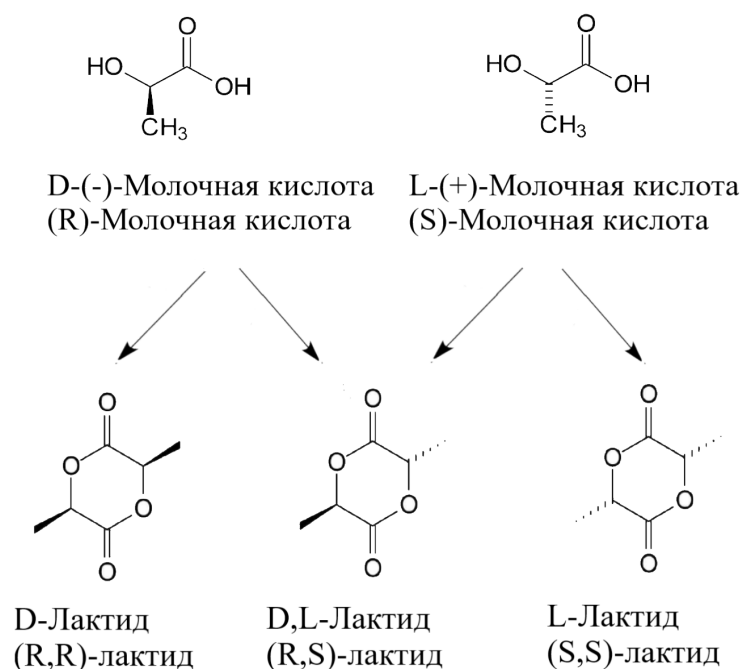


Рисунок 3. Энантиомерные формы молочной кислоты и лактида [23].

1.2.2. Синтез поли(молочной кислоты)

ПМК может быть получена путем поликонденсации непосредственно из молочной кислоты или путем полимеризации лактида - циклического димера молочной кислоты — посредством полимеризации с раскрытием цикла (ROP). Наличие в молочной кислоте как гидроксильной, так и карбоксильной группы

позволяет ей превращаться непосредственно в полиэфир посредством реакции поликонденсации. Основным недостатком этого метода является низкая молекулярная масса получаемого полимера (несколько тысяч), что обусловлено равновесием между молочной кислотой, олигомерами и водой, образующейся в ходе реакции, а также побочными реакциями, приводящими к образованию кольцевых структур, таких как лактид [23]. Поэтому в настоящее время наиболее распространенным способом получения высокомолекулярной ПМК является полимеризация лактида с раскрытием цикла. Данная реакция позволяет получить ПМК с контролируемой молекулярной массой и высокими выходами.

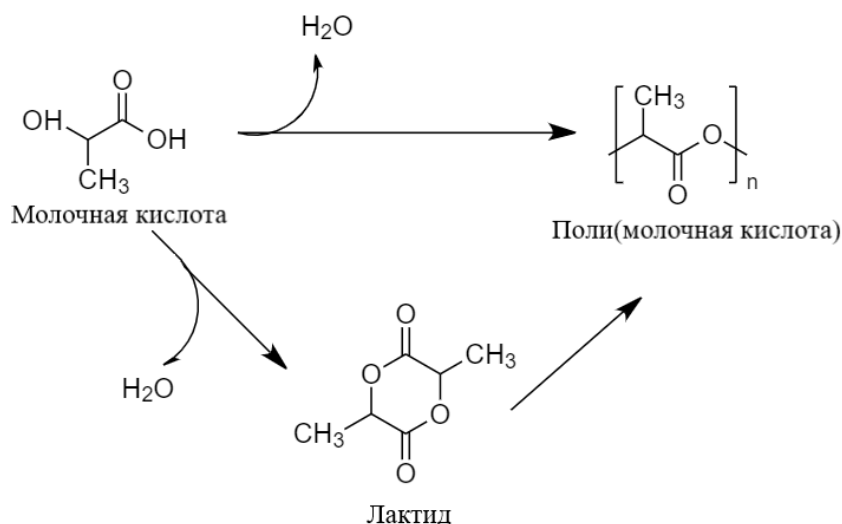


Рисунок 4. Методы синтеза ПМК из молочной кислоты и лактида [21].

После очистки лактид используется для производства ПМК и сополимеров на ее основе с помощью ROP, которая проводится при температурах выше температуры плавления лактидов и ниже температур, которые вызывают деградацию образовавшейся ПМК [21,23].

Полимеризация лактида с раскрытием кольца может проводиться в расплаве, в массе или в растворе с помощью катионных, анионных и координационно-ионных механизмов в зависимости от используемого катализатора. Из-за высокореакционных анионных реагентов, которые препятствуют росту цепи, анионная полимеризация становится причиной нежелательных реакций, таких как рацемизация, реакция

разложения и других побочных реакций. Катионная полимеризация может вызывать нежелательные побочные реакции или рацемизацию из-за нуклеофильной атаки на активный центр. Таким образом, полимеризация по ионно-координационному механизму применяется чаще вследствие небольшого количества побочных продуктов и высоких выходов [23]. Для метода полимеризации с раскрытием цикла было исследовано огромное количество катализаторов на основе металлов. Многие нетоксичные катализаторы, полученные на основе комплексов магния, кальция, цинка, щелочных металлов и алюминия, были разработаны для полимеризации лактидов для решения проблем загрязнения, вызванных катализаторами из тяжелых металлов [22]. Но на данный момент наиболее часто используемыми катализаторами для полимеризации по ионно-координационному механизму являются карбоксилаты и алкоксиды олова и алюминия. Из них наиболее интенсивно применяется 2-этилгексаноат олова (октаноат олова), поскольку он обеспечивает высокую скорость реакции и превращения, а также высокие значения молекулярной массы полимера с низкой полидисперсностью даже в довольно мягких условиях полимеризации [21,23].

Типичный процесс синтеза ПМК включает нагревание лактида до 130–230 °C при пониженном давлении в присутствии 0,05–1,0 мас.% октоата олова.

Поскольку лактид представляет собой циклический сложный эфир, его кольцо может быть открыто нуклеофильным воздействием на сложноэфирную связь, чтобы начать полимеризацию. Сам октоат олова не может выступать в роли нуклеофильного агента, поэтому необходима предварительная активация катализатора с помощью соединений, содержащих гидроксильную группу [23]. Подходящими инициаторами (нуклеофилами) являются вода и спирты, включая гидроксильную группу молочной кислоты. Таким образом, механизм полимеризации включает стадию предварительной инициации, на которой 2-этилгексаноат олова превращают в алкоксид олова путем реакции с гидроксилсодержащим соединением. Затем полимеризация протекает по олово-кислородной связи алкоксидного лиганда, тогда как сам карбоксилат неактивен при полимеризации [21].

Общее содержание гидроксила, включая соинициатора и примеси молочной кислоты, определяет молекулярную массу получаемого полимера. Также молекулярная масса получаемого полимера зависит от молярного отношения

мономера к инициатору, температуры и времени полимеризации. Большое количество инициатора дает короткие полимерные цепи, а небольшое количество дает высокомолекулярный полимер. Чем ниже количество потенциально иницирующих гидроксильных групп в лактидном мономере, тем выше максимально достижимая степень полимеризации. Поскольку вода и молочная кислота могут вызывать расщепление лактида по кольцу и инициировать полимеризацию, их количество в лактиде должно быть низким [21,22].

1.2.3 Свойства ПМК

Продукты ПМК растворимы во многих органических растворителях (диоксане, ацетонитриле, хлороформе, метилхлориде, 1,1,2-трихлорэтане и дихлоруксусной кислоте). Этилбензол, толуол, ацетон и тетрагидрофуран растворяют полилактид при нагревании до температуры кипения. Полимеры на основе молочной кислоты не растворяются в воде, спиртах, таких как метанол, этанол и пропиленгликоль, и в незамещенных углеводородах (например, гексан и гептан) [21].

Свойства гидрофобной ПМК можно модифицировать путем сополимеризации с другими мономерами лактонного типа или другими мономерами с функциональными группами (такими как амино- и карбоксильные группы).

Молекулярная масса оказывает значительное влияние на свойства полимеров, такие как разложение, механическая прочность и растворимость. ПМК с высокой молекулярной массой (например, 1000 кДа) имеет полное время рассасывания от 2 до 8 лет. Это длительное существование *in vivo* в некоторых органах может привести к воспалению [23]. Поэтому, получение ПМК с низкой молекулярной массой (от 5 000 до 50 000 Да) является желательным. Низкомолекулярная ПМК разлагается путем гидролиза сложноэфирных связей в молочную кислоту, что снижает риск накопления материала в ткани. Разложение происходит в два этапа: во-первых, случайное неферментативное расщепление цепи сложноэфирных групп приводит к снижению молекулярной массы, на второй стадии молекулярный вес снижается до тех пор, пока молочная кислота и низкомолекулярные олигомеры не будут естественным образом

метаболизироваться микроорганизмами с образованием углекислого газа и воды [13,21].

Таким образом, ПМК является наиболее распространенным полимером, применяемым для разработки систем доставки лекарств, из-за её биосовместимости, способности к модификации физико-химических свойств и контролируемой скорости разложения *in vivo*.

1.2.4. Системы доставки лекарств на основе полимерных частиц из ПМК

Много работ в настоящее время посвящено разработке систем доставки малых молекул, гормонов и пептидов на основе частиц из ПМК. В одном из исследований были разработаны наночастицы на основе ПМК с размерами от 90 до 110 нм, нагруженные гидрофобным противоопухолевым препаратом оридонином, для использования в качестве перспективной системы доставки лекарств при терапии рака. Эффективность инкапсулирования препарата составляла около 92%. Результаты фармакокинетики показали, что оридонин, инкапсулированный в наночастицы, проявлял высокую противоопухолевую активность, а время его циркуляции в кровотоке увеличилось. Также снизился уровень накопления препарата в здоровых тканях [1].

Также в исследовании [24] ингибитор протеинкиназ тирфостин был загружен в полимерные наночастицы на основе ПМК с размерами 123 ± 23 нм. Инкапсулирование препарата в полимерные носители позволило решить проблему с его быстрым разложением в организме, а также обеспечило пролонгированную доставку лекарства в течение 1 месяца.

В другом исследовании [25] проводилась загрузка нейрорепрессивного соединения савоксепина в наночастицы на основе ПМК с размерами от 300 до 700 нм с эффективностью инкапсулирования до 95 %. Исследования высвобождения *in vitro* показали, что данный тип носителей позволяет обеспечивать пролонгированную доставку препарата более чем на одну неделю в зависимости от размера загруженных частиц. Внутримышечное введение загруженных савоксепином наночастиц

обеспечивало постоянную концентрацию лекарственного препарата в необходимой области.

1.2.5. Поли(ε-капролактон)

Поли(ε-капролактон) (ПКЛ) представляет собой хорошо известный гидрофобный синтетический алифатический полиэфир, который можно классифицировать как полукристаллический со степенью кристалличности до 70 % в зависимости от среднемассовой молекулярной массы. ПКЛ является нетоксичным, биосовместимым и биоразлагаемым полимером, одобренным для терапевтического использования у людей [12].

В настоящее время наблюдается заметная тенденция к росту числа исследований с использованием материалов на основе ПКЛ в качестве систем доставки лекарств, скаффолдов для культивирования клеток и имплантантов для регенеративной медицины, так как данный полимер обладает превосходной биосовместимостью [26].

1.2.6. Получение поли(капролактона)

Хотя возможно получение ПКЛ путем прямой конденсации 6-гидроксикапроновой кислоты, наиболее стандартным методом крупномасштабного синтеза высокомолекулярных полимеров с низкой дисперсностью является полимеризация с раскрытием цикла 7-членного циклического сложного эфира ε - капролактона.

Циклогексанол может окисляться микроорганизмами с образованием смеси ε-капролактона и 6-гидроксикапроновой кислоты. Однако наиболее экономичным путем к получению ε-капролактона является разложение циклогексанона по окислительному циклу типа Байера-Виллигера [20].

Для полимеризации с раскрытием цикла можно использовать анионные, катионные и неионные катализаторы. Как и в случае получения поли(молочной кислоты), предпочтительным методом синтеза поли(капролактона) является полимеризация ε-капролактона по ионно-координационному механизму с

использованием катализаторов на основе комплексов олова и алюминия. Данные катализаторы особенно эффективны для ингибирования обратной реакции и обеспечения высоких значений молекулярной массы получаемого полимера (до 800 кДа) с полидисперсностью, приближающейся к 1,1 [20]. Наиболее часто используемыми катализаторами являются октаноат олова (II) и изопропоксид алюминия (III). Также известно применение катализаторов на основе переходных и редкоземельных металлов.

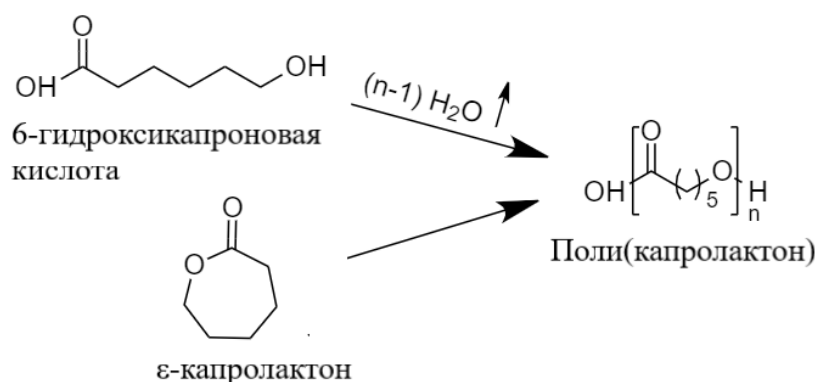


Рисунок 5. Методы получения поли(капролактона) [18].

1.2.7. Системы доставки лекарств на основе частиц из ПКЛ

ПКЛ как биосовместимый и биоразлагаемый полимер подходит для долгосрочной доставки биологически активных веществ в течение одного года. Интерес к поликапролактону связан с его более низкой скоростью деградации по сравнению с другими биоразлагаемыми полиэфирами, которая может быть полезна для длительного высвобождения лекарственного средства или введения долгосрочных имплантантов. Деградация ПКЛ происходит в результате ферментно-независимого гидролиза открытых аморфных областей с выделением кристаллических фрагментов с более низкой молекулярной массой с образованием единственного метаболита 6-гидроксикапроновой кислоты. Материалы из ПКЛ могут быть полностью разрушены бактериальными и грибковыми ферментами, что делает его особенно интересным для применений в качестве биоразлагаемых носителей. В дополнение к ожидаемой

деградации под действием эстераз, есть много свидетельств того, что ПКЛ подвержен ферментативному расщеплению под действием ферментов липазы [18,27]. Продукты, образующиеся в результате гидролиза, метаболизируются организмом либо через цикл трикарбоновых кислот, либо через почечную секрецию [20,28]. Медленная деградация ПКЛ и отсутствие образования кислой среды во время его деградации делают этот полимер пригодным для длительного высвобождения лекарственного средства. Кроме того, высокая растворимость ПКЛ в органических растворителях и способность смешиваться с другими макромолекулами способствуют созданию различных потенциальных структур в качестве терапевтических агентов. Полукристаллическая природа ПКЛ помогает регулировать профиль высвобождения инкапсулированного агента. Сообщалось, что увеличение кристалличности в структуре снижает проницаемость за счет уменьшения растворимости захваченного лекарственного средства и увеличивает извилистость диффузионного пути [28]. Несмотря на то, что ПКЛ широко используется в фармацевтической области, его гидрофобные характеристики приводят к быстрому удалению из организма, а также к низкой стабильности полимерных частиц в воде. Для повышения стабильности частиц ПКЛ необходима модификация поверхности.

ПКЛ является одним из наиболее часто используемых полимеров для создания гидрофобного блока в мицеллярных структурах для доставки лекарств. ПКЛ может быть сополимеризован с другими синтетическими полимерами, такими как поли(этиленгликоль) и поли(этиленоксид), чтобы получить новые производные поли(капролактона) с различными новыми свойствами [26].

Существует несколько исследований, посвященных использованию ПКЛ в качестве систем доставки лекарств с благоприятными характеристиками загрузки и высвобождения лекарственного средства, в частности, для гидрофобных противораковых молекул. В одном из экспериментов были успешно подготовлены наночастицы на основе сополимера поли(этиленгликоль)-блок-поли(ϵ -капролактон) (ПЭГ- β -ПКЛ) с инкапсулированным доцетакселом для терапии глиобластомы. Исследования клеточного поглощения на клетках глиомы человека U87 показывают, что загруженные препаратом частицы ПЭГ- β -ПКЛ усиливают проникновение в

опухоль и увеличивают локальную концентрацию препарата в опухолевых тканях. Эффективность загрузки лекарственного средства составила 42 % при размер частиц около 5-20 мкм [10].

1.2.8. Поли(этиленгликоль)

Гидрофильные полимеры, такие как ПЭГ, блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, полисорбаты 80 и 20, полисахариды, подобные декстрану, могут быть использованы для эффективного покрытия поверхности гидрофобных полимерных частиц, и приводить к изменению свойств носителей. Данные покрытия обеспечивают присутствие гидрофильных или нейтральных цепей на поверхности частиц, которые повышают стабильность суспензии в водной среде за счет эффекта отталкивания посредством стерического механизма стабилизации [8].

Также модификация поверхности частиц гидрофильными полимерами уменьшают естественный процесс опсонизации и распознавания макрофагами систем доставки лекарств, что увеличивает период полувыведения частиц из кровяного русла [15]. Гидрофильные полимеры могут быть введены на поверхность двумя способами, либо путем адсорбции на поверхности, либо путем использования блочных или разветвленных сополимеров [29].

ПЭГ представляет собой водорастворимый неионный полимер, который стал золотым стандартом для модификации полимерных частиц. Поли(этиленгликоль) обычно используется в различных формах систем доставки лекарств из-за его превосходных физико-химических и биологических свойств, таких как растворимость в воде, биосовместимость, низкая токсичность и стабильность к адсорбции белков [3,30]. Также концевые группы ПЭГ легко подвергаются модификации.

Например, ПЭГ был успешно использован для модификации поверхностных свойств наночастиц ПКЛ для инкапсулирования липофильного препарата таксола. Благодаря гидрофильной внешней оболочке ПЭГ и гидрофобному внутреннему ядру ПКЛ — гидрофобный таксол может быть эффективно загружен в наночастицы на основе сополимера ПЭГ-б-ПКЛ [1].

Также в проведенных экспериментах было продемонстрировано, что наночастицы на основе амфифильных блок-сополимеров ПЭГ-ПКЛ, загруженные

противоопухолевым препаратом тамоксифеном, значительно повышали уровень накопления препарата в опухоли и демонстрировали многообещающую противоопухолевую активность. Эффективность инкапсулирования лекарства достигала 90% при содержании тамоксифена в районе 10% по массе полимера [31].

1.3. Получение полимерных частиц

В настоящее время существует большое количество различных способов синтеза микро- и наночастиц на основе биоразлагаемых полимеров. Для получения монодисперсных частиц, обладающих высокой стабильностью и контролируемыми свойствами, такими как размер и скорость разложения, важно выбрать оптимальную технологию и параметры синтеза полимерных носителей. Выбор метода также важен для повышения эффективности загрузки лекарственного средства и контроля его высвобождения.

Исследованные методы получения частиц можно разделить на 2 группы: 1) методы на основе полимеризации мономеров и 2) методы на основе диспергирования предварительно сформированных полимеров. В первом случае происходит полимеризация одного или нескольких мономеров в присутствии катализатора и поверхностно-активных веществ (эмульгаторов) либо в мицеллах эмульгатора (эмульсионная полимеризация), либо в диспергированных в водной фазе каплях мономера (суспензионная полимеризация) либо на границе раздела фаз двух несмешивающихся жидкостей (межфазная полимеризация) [32]. Получение частиц методом полимеризации имеет существенное ограничение: возможность присутствия часто токсичных мономеров, инициаторов, эмульгаторов и побочных продуктов.

Получение частиц на основе уже сформированных полимеров позволяет избегать описанной проблемы. Поэтому данный метод всё чаще применяется для получения частиц на основе биоразлагаемых полимеров. Широко используемые методы, применяемые для формирования полимерных микро- и наночастиц, представляют собой эмульсионные методы, метод высаливания и метод наноосаждения [3]. Загрузка лекарства происходит во время формирования полимерных контейнеров. Лекарственное средство растворяют в необходимом

растворителе и смешивают с раствором полимера. Если лекарственное средство обладает гидрофобными свойствами, то его вместе с полимером растворяют в органическом растворителе, чтобы способствовать инкапсулированию лекарственного средства во время образования частиц [33].

1.3.1. Эмульсионные методы на основе испарения растворителя

Метод эмульсии представляют собой один из распространенных методов получения полимерных частиц в диапазоне размеров от 100 нм до 100 мкм [3]. В зависимости от размера образованных капель эмульсии можно разделить на микро- (10–100 нм), мини (нано)- (100–1000 нм) и макроэмульсии (0,5-100 мкм) [34]. В последние годы производство субмикронных эмульсий (с размерами частиц до 1000 нм) с узким распределением по размерам в качестве систем доставки лекарственных препаратов привлекают значительное внимание фармацевтической промышленности.

Эмульсию можно определить как «гетерогенную систему, состоящую из двух несмешивающихся жидкостей, одна из которых (дисперсная фаза) диспергирована в виде капель, диаметр которых, как правило, превышает 0,1 мкм, по всей другой жидкости (непрерывная фаза)».

Стандартные методы эмульгирования основаны на приготовлении эмульсии масло-в-воде (одинарная эмульсия) или вода-в-масле-вода (двойная эмульсия). Метод одинарной эмульсии подходит для инкапсулирования гидрофобных соединений, в то время как метод двойной эмульсии и используется для инкапсулирования гидрофильных лекарств [3]. Эмульсии типа масло-в-воде содержит мелкие капельки масла, диспергированные в непрерывной водной фазе, причем каждая капля масла окружена защитным покрытием из эмульгаторов (поверхностно-активных веществ), которые добавляются для дополнительной стабилизации эмульсии. Наиболее часто используемыми ПАВ являются: натрий додецилсульфат, тритон X100, поли(виниловый спирт), полисорбат-80, полуксамер-188. Если водная фаза диспергирована в органическом растворителе, то это эмульсия вода-в-масле [35].

Процесс получения частиц методом одинарной эмульсии состоит из следующих стадий: смесь полимера и лекарственного средства в неполярном органическом растворителе (таком как дихлорметан, хлороформ или этилацетат) по каплям вводится в водную фазу (содержащую поверхностно-активные вещества) при постоянном перемешивании и обработке ультразвуком. После образования стабильной эмульсии органический растворитель выпаривают либо при повышении температуры, либо под давлением, либо при непрерывном перемешивании. После испарения органического растворителя с поверхности капель концентрация полимера увеличивается, достигая критической точки, в которой концентрация полимера превышает его растворимость в органической фазе, что приводит к осаждению полимера с образованием микрочастиц [2,31].

Изменение физико-химических свойств полученных полимерных частиц можно контролировать путем корректировки концентрации полимера и лекарственного средства, природы растворителей, типа и количества поверхностно-активного вещества и мощности обработки ультразвуком [3].

1.3.1.1. Механизм процесса

Двумя основными процессами, происходящими во время эмульгирования, являются: (1) деформация и разрушение капель, увеличивающая удельную площадь поверхности эмульсии, и (2) стабилизация этой свежей поверхности раздела эмульгатором для предотвращения повторного слияния вновь образованных капель [35]. Эти стадии происходят одновременно, и относительные скорости этих двух процессов определяют окончательный размер капли.

Для формирования эмульсий требуется: большое количество энергии или присутствие необходимого количества ПАВ, либо их комбинация для диспергирования дисперсной фазы в форме маленьких капель, поскольку дробление крупных капель на более мелкие требует дополнительных затрат энергии, так как сопротивление вязкой среды при перемешивании поглощает большую часть энергии [34]. Энергия может обеспечиваться различными способами, а именно механическим

перемешиванием (мешалка, коллоидная мельница, смеситель, механический гомогенизатор) или ультразвуком. Необходимо использовать ультразвук высокой мощности, акустические волны низкой интенсивности [36].

На начальном этапе приготовления эмульсии во время добавления органической фазы в водную образуются капли грубой предварительной смеси, которые разрушаются под воздействием ультразвука. На втором этапе формируются капли нано- и микроразмеров, которые должны быть стабилизированы и защищены от дальнейшего процесса коалесценции. Для этого в систему добавляются эмульгаторы (ПАВ) [36,37]. Поверхностно-активные вещества представляют собой амфифильные соединения, имеющие гидрофильные и гидрофобные области в своих молекулах. Они имеют длинный углеводородный хвост и относительно небольшую ионную или полярную головную группу. Амфифилы могут быть ионными (катионными, анионными), цвиттер-ионными или неионными в зависимости от природы их головных групп. Благодаря своей амфифильной структуре поверхностно-активные вещества могут адсорбироваться на границе раздела между двумя фазами, тем самым стабилизируя капли дисперсной фазы эмульсии. ПАВ уменьшают межфазное натяжение и межфазную энергию, что способствует разрыву капель предварительной смеси на начальном этапе образования эмульсии. Также молекулы стабилизатора, прикрепляясь к поверхности частиц, создают защитный барьер, препятствующий взаимодействию между частицами [38].

1.3.1.2. Стабилизация эмульсии

Существует два основных механизма термодинамической стабилизации эмульсии поверхностно-активными веществами, а именно стерическая стабилизация и электростатическое отталкивание [39]. При стерической стабилизации обычно используются неионные ПАВ (полисорбат и лецитин) и амфифильные блок-сополимеры, такие как поли(виниловый спирт), полуксамер, Лутрол F-68 [40]. Молекулы полимера начинают адсорбироваться на гидрофобной поверхности частицы посредством неспецифических взаимодействий между гидрофобной группой полимерной матрицы и ПАВ. Адсорбция молекул ПАВ на поверхности частиц уменьшает межфазное натяжение на границе раздела фаз. Это приводит к увеличению

скорости зародышеобразования и, следовательно, уменьшает размер осажденных частиц.

При электростатической стабилизации наиболее эффективной процедурой стабилизации дисперсий частиц является использование ионных поверхностно-активных веществ (додецилсульфат натрия, натриевая желчная кислота) и ионных полимеров (хитозан, полистиролсульфонат). Такие ПАВ адсорбируются на поверхности частиц, что объясняется сильным ван-дер-ваальсовым взаимодействием между поверхностью ПАВ и повторяющимися мономерными звеньями полимерной цепи [39]. Образуется прочный электрический двойной слой вокруг частиц гидрофобного полимера, который вызывает отталкивание между приближающимися частицами из-за одинаковых зарядов на поверхности частиц.

Иногда использование только одного вида ПАВ недостаточно для стабилизации. Поэтому применяется использование нейтральных ПАВ вместе с ионными поверхностно-активными веществами, что демонстрирует синергетический эффект для контроля размера частиц и обеспечивает лучшую коллоидную стабильность [39].

Чтобы стабилизировать образующуюся эмульсию полимерных частиц, в качестве ПАВ часто используют поли(виниловый спирт) (ПВС), поскольку он биосовместим и нетоксичен, а также позволяет получать частицы с оптимальными размерами и максимальной эффективностью инкапсулирования без агрегации частиц. Гидрофильные гидроксильные группы ПВС взаимодействуют с водной фазой, в то время как виниловая цепь взаимодействует с органическим растворителем, что делает образующуюся эмульсию более стабильной. Изменение концентрации и количества ПАВ влияет на стабильность эмульсии и размер микросфер [41].

1.3.1.3. Ультразвуковая гомогенизация

С другой стороны, для стабилизации коллоидной системы можно использовать ввод энергии для компенсации избыточной поверхностной энергии. Высокая скорость перемешивания обеспечивает стабилизацию диспергированных капель за счет

ингибирования агломерации, которая происходит в некоторой степени в результате увеличения кинетической энергии. Кинетическая энергия в виде ультразвуковых волн или высоких скоростей струй, генерируемых устройствами быстрого перемешивания, может использоваться для дополнительной стабилизации системы[39].

Ультразвуковая гомогенизация была признана наиболее быстрой и эффективной техникой для контроля размера частиц и распределения по размерам в эмульсионных методах [39]. Когда наконечник зонда ультразвукового датчика контактирует с жидкостью, он генерирует механические колебания. Мощные ударные волны распространяются по всему раствору в непосредственной близости от излучающей поверхности наконечника, тем самым разбивая рассеянные капли [36]. Применение ультразвука вызывает высокое перенасыщения и увеличивает скорость перемешивания более чем в 10 раз по сравнению с механическим перемешиванием, что увеличивает скорость нуклеации и приводит к получению более мелких частиц.

1.3.1.4. Контроль размера микрочастиц

На размер получаемых микрочастиц могут влиять концентрация полимера, температура, вязкость раствора, скорость перемешивания эмульсии, природа и количество используемого эмульгатора.

В одном из исследований использовали сканирующую электронную микроскопию, чтобы показать, что размер сферы зависит от температуры; более низкие и более высокие температуры дают большие сферы, тогда как промежуточные температуры дают меньшие сферы. При низких температурах более высокая вязкость раствора приводит к образованию более крупных сфер. Большие сферы были получены также при высоких температурах из-за более высокой скорости испарения растворителя, что приводит к более высокому давлению потока растворителя, перемещая больше полимерного материала из центра сферы наружу. Также было исследовано изменение размера частиц в зависимости от скорости перемешивания и влияния эмульгатора. Было показано, что размер микрочастиц уменьшался с увеличением скорости перемешивания, поскольку повышенное перемешивание приводит к образованию более тонких эмульсий [18,42].

1.3.1.5. Влияние концентрации ПАВ на распределение частиц по размерам

Влияние концентраций различных ПАВ, таких как ПВС и SDS на физико-химические свойства получаемых частиц активно изучается. В одном из исследований, было показано влияние ПВС на размер частиц при концентрациях ПВС от 0,25% до 2,5% мас./об. Было обнаружено, что меньшие размеры частиц получаются при больших концентрациях SDS. Тогда как при концентрации ПВС от 0,5% до 2,5% размеры полученных микрочастиц увеличиваются от 40 до 350 мкм [38], что связано с повышением вязкости раствора, содержащего большое количество высокомолекулярного ПВС. Помимо увеличения размера частиц было продемонстрировано снижение эффективности инкапсулирования при более высоких концентрациях ПВС (2,5% мас./об.), что может быть объяснено увеличением растворимости лекарственного средства в воде. Небольшое количество ПАВ не смогло стабилизировать частицы, что привело к агрегации и образованию контейнеров большого размера, тогда как оптимальная концентрация стабилизатора привела к образованию частиц с небольшим размером. Следовательно, концентрация ПВС 2,0% мас./об. считалась оптимальной [43]. Также было исследовано влияние концентрации ПАВ (SDS) на размер полимерных частиц на основе поли(молочной кислоты-*co*-гликолида) (ПЛГА). В исследовании использовался низкомолекулярный полимер 5–15 кДа [42]. Было выявлено, что когда концентрация SDS была ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ) (1,2 мг/мл для SDS), средний размер частиц уменьшался с 69 нм (0,4 мг/мл SDS) до 46 нм (1,2 мг/мл SDS). Индекс полидисперсности увеличился с 0,170 до 0,227 для того же диапазона концентраций SDS. Уменьшение размера можно объяснить уменьшением поверхностного натяжения с увеличением концентрации ПАВ вплоть до ККМ. Хотя размер уменьшился, индекс полидисперсности образовавшихся наночастиц увеличивался с увеличением концентрации SDS. Увеличение полидисперсности предполагает, что избыток SDS был ответственен за агрегацию частиц путем взаимодействия между полярными головками SDS [41,42].

1.3.1.6. Влияние концентраций полимера и ПАВ

Исследование влияния различных концентраций ПЛГА было проведено для низкомолекулярных полимеров (5–15 кДа). Увеличение с 5,3 до 14,4 % (мас./мас.) концентрации ПЛГА привело к увеличению размера частиц для двух концентраций SDS, 2 и 4 мг/мл. Для концентрации SDS 2 мг/мл наблюдалось значительное увеличение размера с 39 до 53 нм, а для концентрации SDS 4 мг/мл размер наночастиц увеличивался с 36 до 42 нм. Значительное увеличение размера позволяет предположить, что количество ПАВ было недостаточным для поддержания стабильности капель, и произошло слияние капель. Размер наночастиц уменьшился, когда концентрация SDS увеличилась с 2 до 4 мг/мл для всех протестированных концентраций полимера (от 5,3 до 14,4 % мас./мас.). Результаты также показали, что было возможно увеличить концентрацию полимера почти в три раза (с 5,3 до 14,4 %, мас./мас.) без образования частиц размером более 100 нм.

Таким образом, окончательный размер образующихся капель эмульсии зависят концентрации ПАВ. Концентрация эмульгатора должна быть достаточной, чтобы полностью покрыть уже существующую границу раздела масло-вода и быстро увеличивающуюся свежую границу раздела, созданную в процессе эмульгирования. Эмульгатор должен максимально эффективно уменьшать межфазное натяжение, а также создавать вокруг частиц стойкий слой, стабилизирующий капли за счет стерического или электростатического отталкивания [34].

1.3.1.7. Влияние молекулярной массы полимера

Также были изучены размер частиц, распределение по размерам и дзета - потенциал частиц в зависимости от использования разных молекулярных масс ПЛГА в трех диапазонах: низкая молекулярная масса (от 5 до 15 кДа), средняя (от 40 до 75 кДа) и высокая (от 90 до 126 кДа). Было обнаружено, что размер частиц увеличивается с увеличением молекулярной массы полимера с 39 до 67 нм. Распределение по размерам улучшилось для полимера с высокой молекулярной массой (0,127) по сравнению с низкой (0,217). Различия в размере наночастиц между низкой и средней молекулярной массой ПЛГА, а также низкой и высокой

молекулярной массой ПЛГА были значительными. Разница в размерах сформированных контейнеров из полимерных носителей средней и высокой молекулярной массой ПЛГА была несущественной [42].

1.3.1.8. Влияние количества лекарственного средства на размер частиц

Количество лекарственного средства, которое может быть инкапсулировано, зависит от термодинамической совместимости лекарства и полимера и растворимости в органическом растворителе. Влияние соотношения лекарственное средство : полимер на эффективность инкапсулирования и размер частиц было изучено при различных соотношениях лекарственное средство : полимер, таких как 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30 и 1:60. Увеличение соотношения с 1:1 до 1:15 вызвало увеличение эффективности инкапсулирования и уменьшение размера частиц.

Тем не менее, дальнейшее увеличение соотношения лекарственное средство : полимер увеличило размер частиц. Это может быть связано с тем, что увеличение концентрации полимера повышало вязкость органической фазы, что приводило к быстрой диффузии органической фазы в водную. Более высокие концентрации полимера приводили к образованию грубых дисперсий и большим размерам частиц, вероятно, из-за недостаточного количества стабилизатора, присутствующего в водной фазе [41].

1.3.2. Метод наноосаждения

Среди различных методов, используемых для синтеза полимерных частиц, метод наноосаждения представляет собой простой и быстрый одностадийный процесс, позволяющий получать моодисперсные полимерные частицы в диапазоне размеров от 50 до 300 нм [44]. В этом методе полимер и лекарственное средство растворяют в полярном смешивающемся с водой растворителе (этанол, ацетон, ацетонитрил или тетрагидрофуран). Затем раствор при перемешивании добавляют к большому количеству водной фазы (осадителя), в которой полимер малорастворим [3]. Вводимый растворитель распадается на маленькие капли, которые снова распадаются на все более мелкие и мелкие части до тех пор, пока не останутся неразделимые полимерные агрегаты, тем самым обеспечивая воспроизводимое

получение полимерных наночастиц с узким распределением по размеру. Летучий органический растворитель удаляется из системы в результате непрерывного перемешивания [44].

Важными параметрами, влияющими на физико-химические свойства наночастиц, являются смешиваемость органического растворителя с водой (или любым третьим компонентом, используемым для осаждения полимера) и природа взаимодействий полимер / растворитель / вода [45].

Наноосаждение обычно используется для инкапсулирования гидрофобных препаратов, поскольку эффективность загрузки гидрофильных соединений низкая из-за плохого взаимодействия их с гидрофобным полимером. Это плохое взаимодействие приводит к диффузии гидрофильного лекарственного средства из органической в водную фазу [3]. Образование наночастиц происходит в результате того, что при смешивании органической фазы с водной смешанный бинарный раствор становится плохим растворителем для гидрофобных полимерных цепей, и в системе происходит разделения фаз, что приводит к образованию частиц гидрофобного растворенного вещества. При соответствующих условиях этот процесс мгновенно генерирует дисперсию мелких капель или наночастиц с узким унимодальным распределением [3,46]. Данный метод имеет ряд преимуществ, отличающий его от методов эмульсии: он прост, не требует большого затрата энергии и использования ПАВ.

1.3.2.1. Узо-эффект

Для целей медицины необходимо точно контролировать распределение размеров наночастиц по размеру, что может быть достигнуто подбором необходимых условий наноосаждения с использованием так называемого «эффекта Узо». При определенных концентрациях полимера, растворителя и воды на тройной фазовой диаграмме Гиббса между бинодальной и спинодальной кривыми образуется термодинамически метастабильная область («область Узо»), в которой образуются стабильные полимерные наноразмерные частицы [46]. На фазовой диаграмме тройной системы растворенное вещество / растворитель / осадитель бинодальная кривая соответствует пределу смешиваемости в зависимости от состава, тогда как

спинодальная кривая определяет предел термодинамической устойчивости. Система развивается путем зарождения растворенных частиц (или капель) в метастабильной области фазовой диаграммы или путем спинодального разложения, т.е. самопроизвольного роста флуктуаций концентрации [44].

В качестве визуализации эффекта Узо была выбрана трехкомпонентная фазовая диаграмма («диаграмма Узо») в виде треугольника, где указаны массовые доли растворенного вещества (полимера) на абсциссе и массовые доли растворителя (органической фазы) по ординате (рис. 6.). Концентрация третьего компонента (водной фазы) определяется по разнице. На этой диаграмме можно найти метастабильную область, где пересыщение позволяет формировать стабильные суспензии наночастиц. Количества полимера, органической и водной фаз выбираются таким образом, чтобы достичь желаемых характеристик получаемых полимерных частиц [39,44]. Фазовые диаграммы Гиббса могут быть использованы для демонстрации влияния изменений объемных долей различных фаз на фазовое поведение системы. Каждый из трех компонентов, составляющих систему, находится на вершине треугольника, где их соответствующая объемная доля составляет 100%.

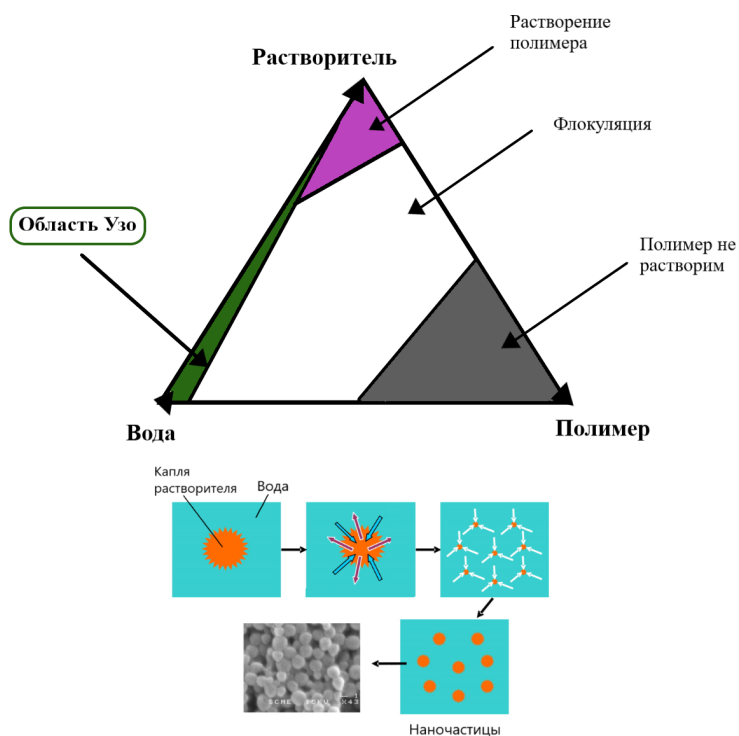


Рисунок 6. Трехкомпонентная фазовая диаграмма системы полимер / растворитель / осадитель и схематическое описание процесса нуклеации в области Узо [46].

1.3.2.2. Механизм формирования частиц

Основной движущей силой наноосаждения является быстрое и высокое перенасыщение раствора в результате быстрого смешивания органической и водной фазы. Когда раствор, состоящий из гидрофобного растворенного вещества в полярном смешивающемся с водой растворителе, смешивают с большим количеством воды, концентрация растворенного вещества в полученном растворе превышает его предел термодинамической растворимости. Отношение фактической концентрации растворенного вещества к равновесной растворимости определяет пересыщение раствора [39,46]. Локальное перенасыщение гидрофобных растворенных молекул после достижения критической концентрации нуклеации приводит к самопроизвольному зародышеобразованию (из-за небольших локальных флуктуаций концентрации растворенных молекул) в виде мелких частиц и росту частиц путем коагуляции и конденсации с последующей агломерацией в случае неконтролируемого роста [39,46].

Скорость нуклеации и критический радиус ядра чрезвычайно чувствительны к перенасыщению. При низком перенасыщении образуется мало стабильных ядер, тогда как высокое перенасыщение дает большое количество очень маленьких ядер. В случае наноосаждения гомогенное пересыщение требует, чтобы смешивание водной и органической фаз и связанная с этим молекулярная диффузия компонентов были чрезвычайно быстрыми по сравнению со скоростью нуклеации наночастиц [45].

Когда число ядер очень велико, рост происходит в основном за счет случайных столкновений существующих частиц. Вероятность столкновения пропорциональна квадрату числа частиц, и предполагается, что каждое столкновение вызывает агрегацию двух вовлеченных частиц. Прогнозируется, что средний размер будет линейно увеличиваться со временем. Ожидается, что очень высокое перенасыщение благоприятствует механизму агрегации, тогда как при низком перенасыщении нуклеация и рост являются доминирующим механизмом [46]. В результате объемная концентрация растворенного вещества уменьшается. Падение концентрации замораживает образование любых дополнительных ядер и приводит к росту уже сформированных ядер путем агрегации и ассоциации с молекулами растворенного

вещества в объеме. Рост продолжается до тех пор, пока концентрация растворенного вещества не достигнет равновесной концентрации насыщения [45].

Более высокие скорости нуклеации приводят к осаждению наночастиц, так как в таком случае пересыщение в основном расходуется на зародышеобразование, а не на рост частиц. Поэтому для получения наночастиц с узким распределением по размеру необходимо: создать высокую степень пересыщения, равномерное пространственное распределение концентраций в растворах и незначительный рост всех объектов [39]. Следовательно, чтобы позволить наночастицы меньше нескольких сотен нанометров, нуклеация должна быть предпочтительнее роста. Высокие скорости нуклеации обеспечивают высокую плотность ядер, что приводит к высоким выходам наночастиц. Когда рост благоприятствует зародышеобразованию, образуется мало ядер, и, вероятно, они вырастут до частиц микронного размера. Уменьшение размера частиц до нанометрового масштаба увеличивает отношение площади поверхности к объему. Это большое увеличение площади поверхности увеличивает избыточную поверхностную энергию, что является термодинамически неблагоприятным. Увеличение поверхностной энергии ускоряет агломерацию частиц, чтобы минимизировать избыточную поверхностную энергию. Во время агломерации две более мелкие частицы конденсируются и образуют агломераты большего размера. Помимо агломерации, существует несколько других механизмов, таких как вторичная кристаллизация и созревание по Оствальду, которые дестабилизируют состав наночастиц. При вторичной кристаллизации рост кристаллов происходит над первоначально сформированными кристаллами в маточном растворе, тогда как при созревании в Оствальде мелкие частицы сжимаются/растворяются из-за повышенной растворимости. Растворяющееся таким образом вещество диффундирует к поверхности более крупных частиц, вызывая их рост [39,44].

Взаимодействие частиц нанометрового размера зависит от межфазных сил, таких как силы притяжения, отталкивания и стерических сил. Такие взаимодействия между двумя частицами называют коллоидными взаимодействиями, и стабильность наночастиц сильно от них зависит [39,45]. Следовательно, стабилизация наночастиц достигается путем минимизации данных коллоидных взаимодействий.

1.3.2.3. Стабилизация наночастиц

Стабилизация первичных наночастиц имеет решающее значение для поддержания небольших размеров. Медленные процессы, происходящие в более длительном масштабе времени, такие как созревание по Оствальду и/или дальнейшая агрегация наночастиц, могут привести к образованию крупных полидисперсных частиц. Удаление органического растворителя из водной фазы может уменьшить созревание Оствальда, таким образом, увеличивая стабильность частиц [47]. В отличие от эмульсионных методов, в методе наноосаждения, благодаря подбору необходимых концентраций компонентов для попадания в метастабильную область Узо, для предотвращения агрегации не требуется использование стабилизаторов. Можно получить стабильную суспензию наночастиц, если частицы состоят из амфифильных блок-сополимеров и обладают ненулевым дзета-потенциалом [48].

Молекулярно растворенные амфифильные блок-сополимеры, которые содержат гидрофильные и гидрофобные блоки, самоорганизуются, когда качество растворителя для одного блока снижается. Блок-сополимер препятствует кинетике зарождения и роста растворенных частиц и задерживает рост частиц. Блок-сополимер ингибирует дальнейший рост частиц растворенного вещества и обеспечивает стерическую стабилизацию за счет гидрофильного блока на поверхности частицы. Конечным результатом является меньший размер ПЧ и более узкое распределение по размерам. Блок-сополимер обеспечивает стабилизацию частиц в течение длительных периодов, что позволяет проводить последующую обработку наноконтейнеров и поддерживать первоначальное распределение по размерам [47,48].

1.3.2.4. Влияние молекулярной массы полимера на размер частиц

Наиболее широко используемыми полимерами в методе наноосаждения являются поли(молочная кислота), поли(молочная кислота-со-гликолид), поли(ϵ -капролактон) и соответствующие сополимеры с поли(этиленгликолевым) фрагментом [46]. Систематические эксперименты предоставили информацию о местонахождении области Узо, в которой получают стабильные наночастицы, и определили соответствующие параметры, контролирующие выход продукции, размер и

полидисперсность получаемых частиц. Было исследовано влияние соотношений растворитель / вода, полимер / растворитель, а также влияние молярной массы полимера, природы растворителя и времени перемешивания.

Был изучен ряд полимеров поли(молочной) кислоты с молярной массой от 23 кДа до 125 кДа. При низкой концентрации полимера (5 мг/мл) молярная масса мало влияет на выход наночастиц. Однако для молярных масс, превышающих 32 кДа, средний гидродинамический диаметр частиц увеличивался с увеличением молярной массы (с 100 нм при 23 кДа и 32 кДа до примерно 250 нм при 125 кДа) [45].

1.3.2.5. Влияние концентрации полимера

Чтобы исследовать влияние концентрации полимера на размер частиц [45] и вязкость полученных полимерных растворов, были приготовлены растворы ПЛГА в ацетоне с концентрациями 3,9, 7,8 и 15,6 мг/мл. Растворы полимеров добавляли в водную фазу при постоянной скорости потока 10,6 мл/мин. В эксперименте конечная концентрация полимера в воде поддерживалась постоянной (1.1–1.2 мг/мл), а концентрации полимеров в ацетоне варьировались. Было обнаружено, что введение растворов полимеров с повышенными концентрациями дает более крупные наночастицы. Это поведение объясняется, во-первых, влиянием концентрации полимера на вязкость, а во-вторых, количеством молекул полимера на единицу объема растворителя [49]. Метод наноосаждения основан на быстрой диффузии растворителя во внешнюю водную фазу, что, таким образом, вызывает агрегацию полимера в форме коллоидных частиц. Чем выше концентрация полимера в органической фазе, тем ниже скорость диффузии вследствие увеличивающейся вязкости раствора полимера, и полученные частицы, образующиеся из турбулентного потока органического растворителя, больше. Кроме того, скорость диффузии растворителя в водную фазу несет больше полимерных цепей, когда присутствует большее количество молекул полимера на единицу объема растворителя, которые агрегируют и, таким образом, образуют более крупные наночастицы [45].

1.3.2.6. Влияние растворителя

Также было изучено влияние природы растворителя полимера на значение среднего размера наночастиц. В одном из исследований, независимо от полимера, наночастицы, полученные из ацетоновых растворов, всегда были меньше, чем частицы, полученные из растворов тетрагидрофурана (ТГФ) при тех же условиях. Было высказано предположение, что более низкая вязкость и более высокий коэффициент диффузии ацетона в воде по сравнению с ТГФ должны способствовать более быстрому смешиванию растворителя и воды, что приводит к более равномерному перенасыщению, приводящему к более мелким частицам [50]. Также было исследовано влияние смешиваемости растворителя с водой на размер наночастицы на основе ПЛГА-ПЭГ. Использовались четыре растворителя (ацетонитрил, тетрагидрофуран, ацетон и диметилформамид) и наблюдалось уменьшение среднего размера НЧ при увеличении смешиваемости растворитель/вода [51].

Также влияние различных растворителей на образование наночастиц было изучено путем сравнения результатов, полученных с использованием ацетона, ацетонитрила и тетрагидрофурана в качестве растворителей [45]. ПЛГА растворяли в концентрации 10 мг/мл в различных растворителях, и 1 мл каждого раствора, содержащего полимер, впрыскивали с постоянной скоростью 3,5 мл/мин в 5 мл воды. Средние размеры наночастиц, образованных с ацетоном, ацетонитрилом и ТГФ, были измерены после полного испарения органического растворителя и составили 140, 148 и 185 нм соответственно. Значения размера частиц, полученных с использованием ацетонитрила в качестве растворителя, близки к значениям размера контейнеров, полученных с использованием ацетона, тогда как размер частиц, полученных с использованием ТГФ, значительно больше. Этот результат свидетельствует о том, что критическими параметрами для формирования наночастиц являются, с одной стороны, скорость диффузии, а с другой стороны, вязкость органического растворителя. Поскольку ацетон и ацетонитрил имеют более высокие коэффициенты диффузии и более низкую вязкость по сравнению с ТГФ, меньшие наночастицы образуются из-за более быстрой диффузии растворителя [52].

1.3.2.7. Влияние скорости ввода и перемешивания

Другим важным параметром, связанным с получением наночастиц методом наноосаждения, является процесс смешивания органической фазы, содержащей полимер, с водной фазой. Для исследования влияния скорости ввода органической фазы в водную на размер частиц, ПЛГА растворяли в концентрации 4 мг/мл в ацетоне, и 1 мл этого раствора впрыскивали при различных скоростях потока 3,5, 7,1 и 10,6 мл/мин, соответственно, в 5 мл воды[52]. Показано, что более быстрое смешивание органической фазы, содержащей полимер, с водной фазой приводило к уменьшению среднего размера образующихся коллоидных частиц. В то время как при скорости потока 3,5 мл/мин наночастицы имели средний размер 142 нм, контейнеры, полученные при скорости потока 10,6 мл/мин, были значительно меньше - 121 нм.

Время смешивания органического раствора, содержащего полимер, с водной фазой является решающим параметром. Было показано, что более быстрое перемешивание приводит к уменьшению среднего размера получаемых наночастиц [48,52]. Это объясняется тем, что когда время смешивания больше, чем время агрегации свернутых цепей, размер частиц зависит главным образом от времени перемешивания и начальной концентрации полимера [46].

Таким образом, стабильные суспензии почти монодисперсных полимерных наночастиц могут быть получены с использованием метода наноосаждения в узкой области Узо. Область Узо, расположенная между бинодальной и спиновальной кривыми, соответствует разбавленным растворам полимеров в смешивающихся с водой органических растворителях и большому количеству воды. Образование наночастиц объясняется механизмом нуклеации и роста в перенасыщенном растворе полимера [53].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

D,L- лактид (очищали перекристаллизацией из толуола), метиловый эфир полиэтиленгликоля (ПЭГ, Mn 5000), поливиниловый спирт (ПВС, Mw 130000) были приобретены в компании Aldrich, ϵ -капролактон являлся продукт компании J&K Scientific. 2-Этилгексаноат олова (II) (октоат олова)- продукт компании Sigma.

Растворители: хлороформ, метанол, хлористый метилен, додеканол (Вектон), ацетонитрил (марки J.T.Baker), использовались без дополнительной очистки. Толуол (Вектон) очищали перегонкой над металлическим натрием, гексан (Вектон) перегоняли над гидридом кальция.

Поверхностно-активные вещества: Lutrol F68 компании Sigma, лецитин, лаурилсульфат натрия (SDS) фирмы Roth.

Диализные мембраны MWCO 2 и 100 кДа фирмы Orange Scientific и MWCO 300000 Spectra/Por® Biotech CE компании Serva. Для очистки раствора полимера от примесей использовался гидрофобный шприцевой фильтр PTFE Millex (диаметр насадок 13 мм, размер пор 0,45 мкм).

Диоксадэт был предоставлен ФГБУ «Национальным медицинским исследовательским центром онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

2.2. Оборудование

Для взвешивания сухих реагентов использовались весы OHAUS Adventurer Pro. Для высушивания полученных образцов использовали лиофилизатор VaCo 5–II (ZIRBUS).

Для очищения суспензии полимерных частиц использовалась рефрижераторная центрифуга 2-16 KL (SIGMA).

Анализ гидродинамического радиуса и дзета-потенциала частиц проводился при помощи анализатора частиц (при рассеивающем угле 173 °C) Zetasizer Nano ZS

(Malvern) и при помощи прибора анализатора частиц NanoSight NS300 (Malvern Panalytical).

Для перемешивания использовались магнитные мешалки компании Heidolph и ULAB и термошейкер TC-100C (Biosan).

Для удаления растворителей из системы и получения суспензии частиц в процессе формирования полимерных контейнеров методом одинарной эмульсии использовались роторный испаритель IKA RV 8 V и вакуумная станция PC 3001 VarioPro (Vacuubrand).

Ввод органической фазы в водную проводился с использованием инфузионного насоса Instilar 1438 (Dixon).

Для получения полимерных частиц методом одинарной эмульсии использовались ультразвуковые гомогенизаторы Sonopuls UW 2070 компании Bandelin.

Измерения поглощения в УФ области проводилось на спектрофотометре UV–1800 (Shimadzu).

Хроматографические анализы проводились на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с рефрактометрическим детектором RID 10-A (Япония).

2.3. Методы

2.3.1. Синтез сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК и гомополимера ПМК

Мономер D,L-лактида был перекристаллизован из толуола с последующим промыванием гексаном. Очищенный мономер высушили на фильтре Шотта в течение 24 часов в вакуум-эксикаторе.

Была получена серия образцов сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК и гомополимеров ПМК с варьированием количества исходного мономера, соотношения мономера и инициатора, температуры и времени полимеризации.

Для получения гомополимера были взяты навески D,L- лактида (от 4 до 5 г), для получения сополимера были взяты навески D,L- лактида (5 г) и ПЭГ-5000 (с массой 0,12 г). Соотношение [Лактид]:[ПЭГ-5000] составляло 1500:1. Реагенты помещались в реакционный сосуд Шленка, снабженный магнитной мешалкой. Оставшийся растворитель удаляли при помощи вакуумного насоса, далее добавили 2

мл гексана и снова откачивали растворитель с использованием вакуумной линии. Затем в реакционную смесь вводился катализатор - октоат олова с массовым содержанием 0,3 % от массы мономеров. Полимеризацию проводили в вакууме, на масляной бане в интервале температур 128-138 °С. Время полимеризации варьировалось от 60 до 90 минут. Образовавшийся полимер был растворен в хлороформе, затем данный раствор концентрировали с использованием роторного испарителя и проводили осаждение в двадцатикратном объеме холодного метанола. Полученный полимерный продукт сушили на фильтре Шотта с вакуумным насосом, затем переносили в вакуум-эксикатор на 24 часа.

Выход полимера варьировался в интервале от 60 до 90 %. Для подтверждения структуры гомополимера ПМК и блок - сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК был снят протонный ЯМР спектр. Определение среднечисловой и среднемассовой молекулярной массы, а также полидисперсности полимеров ПМК и ПЭГ-5000-б-ПМК проводилось методом гель проникающей хроматографии.

2.3.2. Синтез сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ и гомополимера ПКЛ

Была получена серия образцов гомо- и сополимеров ϵ -капролактона с поли(этиленгликолем) с варьированием количества исходного мономера, соотношения [мономер]:[инициатор]:[соинициатор], температуры и времени полимеризации.

10 мл ϵ -капролактона помещали в круглодонную колбу на 50 мл, снабженную магнитной мешалкой, добавляли рассчитанные количества ПЭГ-5000, катализатора (октоата олова), соинициатора и продували аргоном для создания инертной атмосферы. Для подбора оптимальных условий использовались различные соотношения [мономер]:[катализатор], [ПЭГ-5000]:[катализатор] и [катализатор]:[соинициатор]. В роли соинициаторов выступали додеканол, ПЭГ-5000 и вода.

Полимеризация проводилась при нагревании на масляной бане в интервале температур 128-138 °С при интенсивном перемешивании. Время полимеризации варьировалось от 4 до 24 часов. После завершения реакции полимерный продукт был растворен в хлороформе и осажден в десятикратном объеме холодного метанола. Полученный полимер оставили сушиться в вакуум-эксикаторе на 24 часа.

Выход полимера варьировался от 75 до 93%. Для определения состава и подтверждения структуры гомо- и сополимера был использован метод ^1H -ЯМР. Определение среднечисловой, среднемассовой молекулярной массы и полидисперсности ПКЛ и ПЭГ-5000-б-ПКЛ проводилось методом гель проникающей хроматографии.

2.3.3. Методы исследования полимеров

Состав и структура блок-сополимеров были подтверждены данными ^1H ЯМР-спектроскопии. Относительный состав сополимера рассчитывался по интегральным интенсивностям сигналов CH_2 -групп полиэтиленгликоля $I_{\text{CH}_2}^{\text{ПЭГ}}$ и CH_3 -групп лактида $I_{\text{CH}_3}^{\text{D,L-полилактида}}$ по формуле:

$$q_{\text{ПЭГ}} = \frac{\frac{1}{4} I_{\text{CH}_2}^{\text{ПЭГ}}}{\frac{1}{3} I_{\text{CH}_3}^{\text{D,L-полилактида}} + \frac{1}{4} I_{\text{CH}_2}^{\text{полиэтиленгликоля}}} * 100 ,$$

где q - % мольных звеньев ПЭГа

Определение среднемассовой, среднечисловой молекулярной массы (M_w и M_n) и дисперсности (M_w/M_n) полимерных образцов проводилось методом гель-проникающей хроматографии. В качестве подвижной фазы использовался ТГФ. Скорость потока элюента составляла 1 мл/мин, температура проведения анализа – 40 °С. Расчет молекулярно-массовых характеристик проводили с использованием калибровочной зависимости, построенной для стандартных образцов полистирола.

2.3.4. Получение инкапсулированных наночастиц на основе гомополимеров ПМК, ПКЛ и сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ методом наноосаждения

50 мг полимера растворяли в 5 мл ацетонитрила (концентрация полимера 10 мг/мл) и оставляли перемешиваться на 24 часа при комнатной температуре. Цитостатический препарат диоксадэт (массой 1, 3 и 6 мг) растворяли в 5 мл

ацетонитрила. Раствор полимера отфильтровывали с использованием гидрофобного (PTFE) шприцевого фильтра, смешивали с раствором диоксадэа, инкубировали полученный раствор полимерного носителя и лекарства в течение 1 часа при перемешивании на шейкере (120 об/мин). Осуществляли ввод органического раствора, содержащего полимер и лекарственный препарат с использованием инфузионного насоса со скоростью 120 мл/час при перемешивании (700 об/мин) добавляли раствор полимера с лекарством в водную фазу (соотношение объемов органической к водной фазе 1:5). Для удаления органического растворителя систему оставляли перемешиваться на 24 часа при комнатной температуре.

Полученную суспензию наночастиц очищали от неинкапсулированного цитостатического препарата диализом в течение 2-3 часов. После диализа серию из 3-х образцов объемом 2 мл лиофильно высушивали и определяли выход. После взвешивания высушенных образцов был рассчитан выход частиц, который находился в диапазоне от 60 до 90 %.

Общую загрузку препарата и эффективность инкапсулирования определяли спектрофотометрическим методом (при длине волны 260 нм).

Полученные полимерные частицы хранились при температуре 4 °С.

2.3.5. Получение инкапсулированных микрочастиц на основе гомополимеров ПМК, ПКЛ и сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ методом одинарной микроэмульсии (масло-в-воде)

100 мг полимера и 6 мг лецитина растворили в 1,2 мл хлористого метилена и оставляли перемешиваться 24 часа при комнатной температуре. Цитостатический препарат диоксадэт (массой 1, 3 и 6 мг) растворили в 0,4 мл хлористого метилена. Готовили водный раствор 0,2 % SDS и 1 % лутрола, и 1 % водный раствор ПВС. Раствор полимера отфильтровывали с использованием гидрофобного (PTFE) шприцевого фильтра, смешивали с раствором диоксадэа и инкубировали в течение 1 часа при перемешивании на шейкере (120 об/мин). Раствор полимера с диоксадэтом вводили со скоростью 120 мл/мин в водную фазу 0,2 % SDS и 1 % лутрола при перемешивании (700 об/мин) и воздействии ультразвука. Полученную эмульсию

вводили в 1 % водном растворе ПВС при перемешивании (1000 об/мин) и ультразвуковом воздействии. Соотношение органической фазы: первой водной фазы: второй водной фазы составляло 1:10:50.

Органический растворитель удаляли из системы, используя роторный испаритель (в интервале давлений от 400 до 70 мбар в течение 2 часов).

Полученную суспензию микрочастиц отделяли от ПВС и неинкапсулированного препарата при помощи центрифуги (10000 g, 15 минут, при температуре 4 °С, 3 раза), таким образом, выделяли частицы крупной фракции. Надосадочный раствор, в котором находились частицы мелкой фракции, очищали от оставшегося диоксидэнта, ПВС и ПАВ с использованием диализных мембран с размерами пор 300 кДа в течение 3 часов.

Для определения выхода полимерных частиц и количеств инкапсулированного лекарственного препарата серию из 3 образцов по 0,5 мл суспензии полученных частиц лиофильно высушивали. После взвешивания высушенных образцов был рассчитан выход полимерных микрочастиц, который лежал в диапазоне от 60 до 90 %.

Общую загрузку препарата и эффективность инкапсулирования определяли спектрофотометрическим методом. Полученные полимерные частицы хранились при температуре 4 °С.

2.3.6. Количественный анализ инкапсулированного препарата

Общая загрузка цитостатического препарата и эффективность инкапсулирования анализировалась методом спектрофотометрии при длине волны, равной 260 нм. Высушенные образцы растворяли в 3 мл хлористого метилена и измеряли оптическую плотность раствора. Эффективность инкапсулирования (ЭИ) и загрузку препарата на 1 мг частиц (Q) вычисляли по формулам:

$$\text{ЭИ} = \frac{\text{Масса инкапсулированного диоксидэнта}}{\text{Общая масса используемого диоксидэнта}} * 100\% ,$$

$$Q = \frac{\text{Масса инкапсулированного диоксидэнта}}{\text{Масса полимерных частиц}} * 1000 .$$

Для количественного определения диоксадэта была построена калибровочная зависимость оптической плотности от концентрации препарата. Для построения калибровочной зависимости 3 мг диоксадэта растворяли в 6 мл хлористого метилена. Далее была проведена калибровка методом объемного разбавления исходного раствора в 2 раза (начальная концентрация препарата 0,5 мг/мл) с последующим измерением оптической плотности.

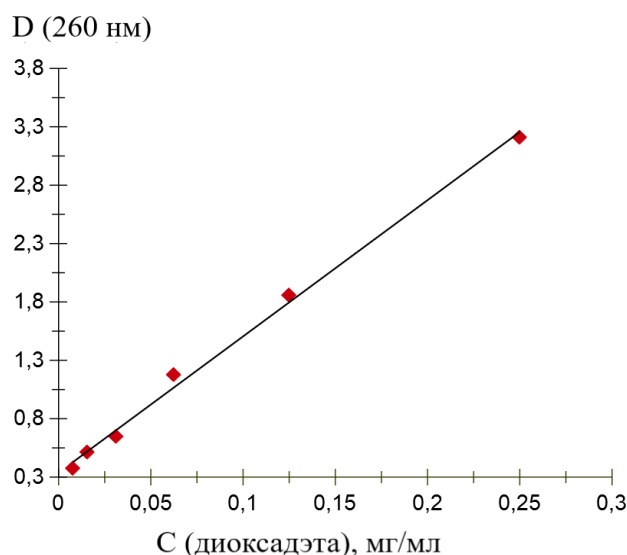


Рисунок 7. Зависимость оптической плотности раствора диоксадэта от концентрации.

2.3.7. Исследование характеристик полимерных частиц

Средний гидродинамический диаметр, полидисперсность и дзета-потенциал полученных нано- и микрочастиц в водной среде определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) с использованием приборов Zetasizer Nano ZS и Nanosight.

Анализ водной суспензии частиц объемом 1,5 мл проводился на приборе Zetasizer под углом обратного рассеяния 173° при комнатной температуре не менее 3-х раз.

Также для исследования размера частиц был использован прибор Nanosight, который использует метод анализа траектории наночастиц. (АТЧ) Суспензию частиц объемом 1 мл вводили в кювету при помощи шприцевого насоса со скоростью 100 мкл/мин при комнатной температуре. Измерения проводились не менее 5 раз.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представляемое исследование ориентировано на получении биоразлагаемых микро- и наночастиц на основе амфифильных блок-сополимеров ПЭГ-5000-*б*-ПМК и ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ, способных эффективно инкапсулировать и контролируемо высвобождать новый гидрофобный противоопухолевый препарат из группы алкилирующих соединений этилениминов - диоксадэт, и осуществления сравнения полученных контейнеров с широко применяемыми носителями на основе гомополимеров алифатических полигидроксикислот ПКЛ и ПМК. Данный препарат применяется при химиотерапии рака яичников. Низкая селективность и быстрое удаление низкомолекулярного лекарства из опухолевой ткани снижает эффективность проводимой терапии. Инкапсулирование препарата в полимерные частицы помогает уменьшить контакт цитостатика со здоровыми тканями, а накопление частиц в опухоли и пролонгированное высвобождение обеспечивают постоянную необходимую концентрацию препарата в пораженной области без дополнительного многократного введения лекарства. Также важно, чтобы используемые частицы были нетоксичны и разлагались после выпуска лекарства с получением безопасных метаболитов. Таким образом, первоочередной задачей было получение биосовместимых и биоразлагаемых гомо- и сополимеров ПКЛ, ПМК с ПЭГ, на основе которых можно получить стабильные в водной фазе полимерные частицы нано- и микроразмеров.

3.1. Синтез гомополимера ПМК и блок-сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК

На первом этапе данной работы была проведена сополимеризация D,L-лактида с гидрофильным поли(этиленгликолем)-5000 для получения блок-сополимера ПЭГ-5000-*б*-ПМК с заданными свойствами. Также для сравнения физико-химических свойств частиц и общей загрузки препарата были получены гомополимеры поли(молочной кислоты). Для получения гомо- и сополимеров ПМК был выбран метод полимеризации лактида с раскрытием цикла по ионно-координационному механизму. На рис. 8. представлена схема получения полимерного продукта. Данный

метод позволяет получить полимеры с контролируемой молекулярной массой и низкой дисперсностью. В качестве катализатора был использован 2-этилгексаноат олова (II). Реакция проходила в расплаве в диапазоне температур от 130-140 °С и с соотношением [мономер]:[катализатор] равном 1000. Отношение лактида молочной кислоты к метиловому эфиру ПЭГ-5000 составляло 1500.

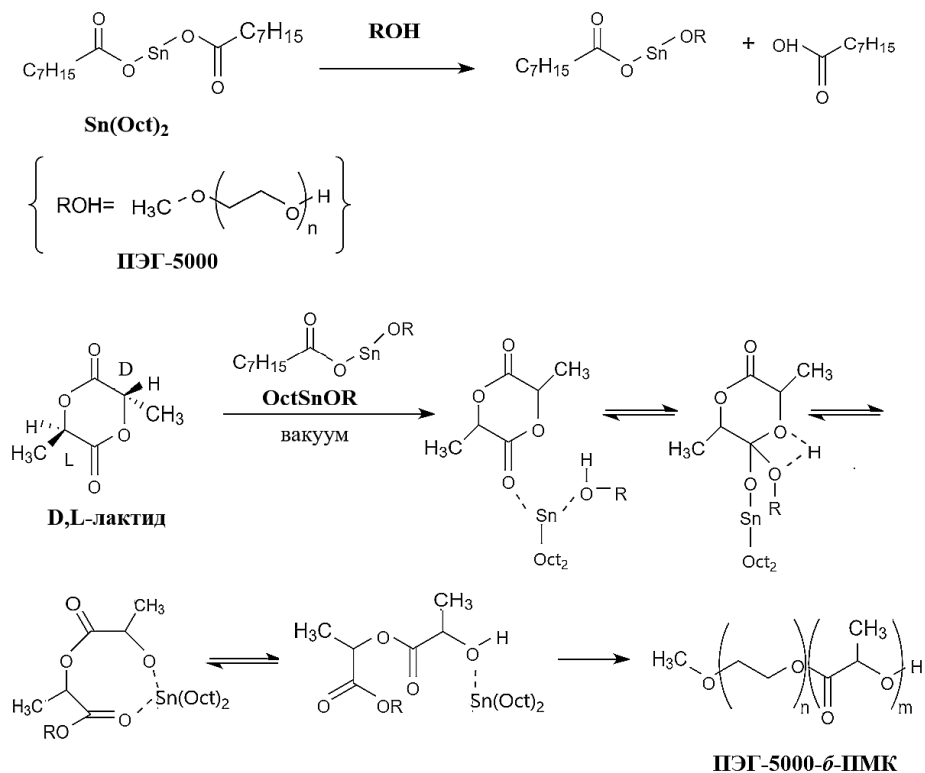


Рисунок 8. Получение сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК полимеризацией с «раскрытием цикла».

Как уже было описано в обзоре литературы, полимеризация лактида проходит в присутствии гидроксилсодержащего соединения (в случае гомополимера это примеси воды и молочной кислоты, в случае сополимеров это ПЭГ-5000), которое активирует катализатор, превращая его в алкоксид олова путем реакции замещения: $\text{Sn}(\text{Oct})_2 + \text{ROH} \rightleftharpoons \text{OctSnOR} + \text{OctH}$. Далее отрицательно заряженный атом кислорода лактида координируется на положительно заряженном атоме олова с последующей нуклеофильной атакой алкоксидного фрагмента активированного катализатора на ацильный атом углерода с раскрытием лактидного кольца и образованием

соответствующего алкоксидного интермедиата, способного к внедрению следующего мономерного звена. Таким образом, проходит рост полимерной цепи. Обрыв цепи происходит в результате атаки гидроксилсодержащих соединений на растущую полимерную цепь или в случае обратной реакции замещения алкоксидного интермедиата с образованием неактивного октоата олова.

Для определения химического состава и подтверждения структуры блок-сополимера был использован метод ^1H -ЯМР. Полученный полимер был предварительно растворен в дейтерированном хлороформе.

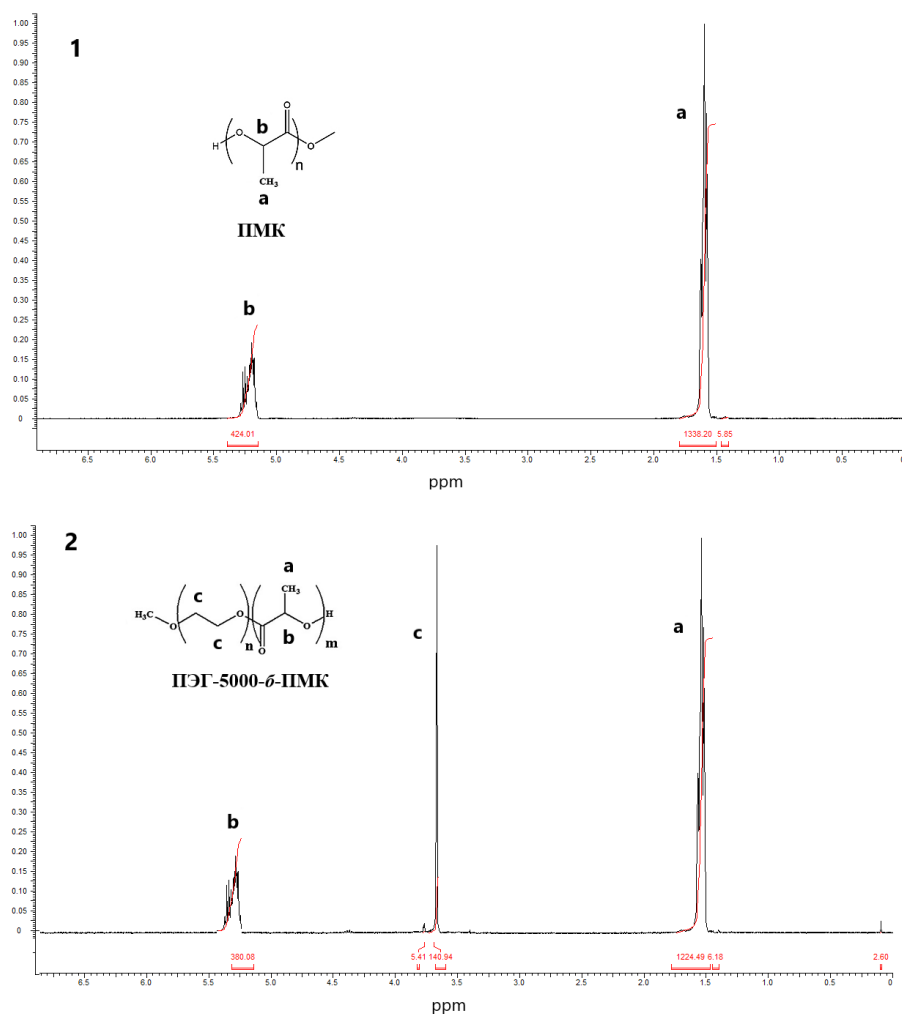


Рисунок 9. Спектр ЯМР ^1H гомополимера поли(молочной кислоты) (1) и сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК (2).

В полученных протонных спектрах, представленных на рис.9., присутствуют сигнал при 1.6 м.д., относящийся к протонам метильной группы ПМК, и мультиплет

при 5.25 м.д., соответствующий метиновым протонам энантиомерных групп во фрагменте поли(D,L-молочной кислоты). На втором протонном спектре появляется сигнал при 3.5 м.д., отвечающий за метиленовые протоны ПЭГ в блок-сополимер ПЭГ-5000-б-ПМК. Также был рассчитан относительный состав сополимера по интегральным интенсивностям. Для образца (со средневесовой молекулярной массой 34 000) было установлено, что полимер содержит 7,9 мол.% звеньев ПЭГ и 92,1 % звеньев молочной кислоты.

Исследование длины полимерных цепей в зависимости от условий синтеза проводили в условиях вариации времени и температуры полимеризации, а также количества мономера и гидроксилсодержащих соединений. Из полученных методом ГПХ данных (табл. 1.) можно сделать вывод, что при увеличении времени полимеризации с 60 до 90 мин повышается молекулярная масса полимера, а выходы полимерных образцов изменяются незначительно.

Таблица 1. Условия полимеризации и характеристики полимерных образцов ПМК и ПЭГ-5000-б-ПМК.

№	Образец	Температура, °C	Время, мин	M _w (ГПХ)	Дисперсность, M _w /M _n	Выход, %
1	ПМК + добавление воды	135	60	7 000	1,1	76
2	ПМК + добавление воды	135	90	26 000	1,1	78
3	ПМК	130	60	178 000	2,3	77
4	ПМК	135	60	323 000	1,3	88
5	ПМК	135	90	583 000	1,1	85
6	ПЭГ-5000-б-ПМК + добавление воды	135	90	34 000	1,2	70
7	ПЭГ-5000-б-ПМК	130	60	67 000	1,9	71
8	ПЭГ-5000-б-ПМК	135	60	160 000	1,9	66
9	ПЭГ-5000-б-ПМК	130	90	347 000	1,1	73

При увеличении времени полимеризации ПМК (образцы 1 и 2 и образцы 4 и 5) при прочих равных условиях, молекулярная масса полученного полимера увеличивается с 7 000 до 26 000 для образцов 1 и 2 и с 323 000 до 583 000 для образцов 4 и 5. Выходы практически не менялись (76 и 78 % для образцов 1 и 2 и 88 и 85 % для образцов 4 и 5 соответственно). Та же тенденция прослеживается и для образцов ПЭГ-5000-б-ПМК. Например, молекулярная масса образцов 7 и 9 увеличивается с 67 000 до 347 000 (с выходами 71 и 73 % соответственно) при увеличении времени полимеризации с 60 до 90 мин.

Повышение температуры полимеризации с 130 до 135 °С также приводит к увеличению молекулярной массы получаемого полимерного продукта. При сравнении образцов 3 и 4 ПМК, снижение температуры с 135 до 130 °С приводит к уменьшению молекулярной массы полимера с 323 000 до 178 000 и к снижению выходов с 88 до 77 %. Также увеличивается M_w сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК (образцы 7 и 8) при повышении температуры полимеризации (с 67 000 до 160 000 при температурах 130 и 135 °С соответственно).

При добавлении гидроксилсодержащих соединений (введение воды или ПЭГ-5000 при получении сополимеров) молекулярная масса полимерных образцов снижается, что связано с обрывом цепи из-за нуклеофильной атаки гидроксилсодержащих соединений на катализатор или растущую полимерную цепь. Добавление воды в реакционную смесь (образцы 1 и 4) при прочих аналогичных условиях приводит к тому, что молекулярная масса полученной ПМК значительно снижается (с 323 000 до 7 000), также происходит уменьшение выхода полимера с 88 до 76 %, но при этом показатель дисперсности становится лучше (с 1,3 до 1,1). Введение воды уменьшает молекулярную массу и в ряду сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК даже при увеличении времени полимеризации (M_w уменьшается со 67 000 для образца 7 до 34 000 для образца 6) и при повышении температуры до 135 °С (образцы 9 и 6, молекулярная масса уменьшается с 347 000 до 34 000 соответственно).

Добавление только ПЭГ-5000 при процессе полимеризации также уменьшает массу получаемого полимерного продукта при прочих равных условиях. При рассмотрении образцов 3 и 7, при температуре полимеризации 130 °С а также образцов 4 и 8 при температуре 135 °С можно заметить, что добавление ПЭГ снижает

молекулярную массу в первой паре со 178 000 до 67 000, во второй со 323 000 до 160 000. С понижением молекулярной массы происходит снижение выхода полимера с 77 до 71 % (для образцов 3 и 7) и с 88 до 66 (для образцов 4 и 8). При исследовании образцов 2 и 6 можно сделать вывод, что при добавлении воды в обе исходные полимеризационные смеси (для получения гомополимера ПМК с M_w 26 000 и сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК с M_w 34 000), наблюдается повышение молекулярной массы сополимера за счет наличия блока ПЭГ с M_n 5000.

При сравнении ПМК без добавления гидроксилсодержащих соединений и сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК с содержанием воды, можно сделать вывод, что совместное добавление ПЭГ и воды значительно снижает молекулярную массу полимерного продукта с 583 000 до 34 000 (образцы 5 и 6) по сравнению с добавлением лишь одного ПЭГ (с 583 000 до 347 000 (образец 9)). Также при добавлении гидроксилсодержащих соединений наблюдается уменьшение выходов полимерных продуктов.

Таким образом, при снижении температуры и уменьшении времени полимеризации, а также при добавлении гидроксилсодержащих соединений можно получить полимеры с низкой молекулярной массой.

Для дальнейших экспериментов были отобраны образцы с различными молекулярными массами (от 7000 до 300 000) для сравнения физико-химических свойств и эффективности инкапсулирования получаемых частиц.

3.2. Синтез гомополимера ПКЛ и блок-сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ

Также была получена серия образцов гомополимеров поли(капролактона) и сополимеров ПЭГ-5000-б-ПКЛ методом полимеризации с раскрытием цикла по ионно-координационному механизму. Выбор данного полимера основан на его биосовместимости, способности растворяться во многих органических растворителях, а также на его более гидрофобных свойствах, чем у ПМК. Данный полимер интересен своей структурой с высокой степенью кристалличности, отличающей его от аморфной поли(D,L-молочной кислоты). Вследствие этого эффективность инкапсулирования и скорость высвобождения частиц на основе ПКЛ могут сильно отличаться от частиц на основе ПМК,

Реакция полимеризации проходила в массе, при температуре от 128 до 138 °С в атмосфере аргона. В качестве катализатора использовался октоат олова. Механизм реакции получения поли(капролактона) идентичен получению поли(молочной кислоты). Полимеризация протекает через образование алкоксида олова, на котором координируется атом кислорода ϵ -капролактона с дальнейшим раскрытием семичленного капролактонового кольца.

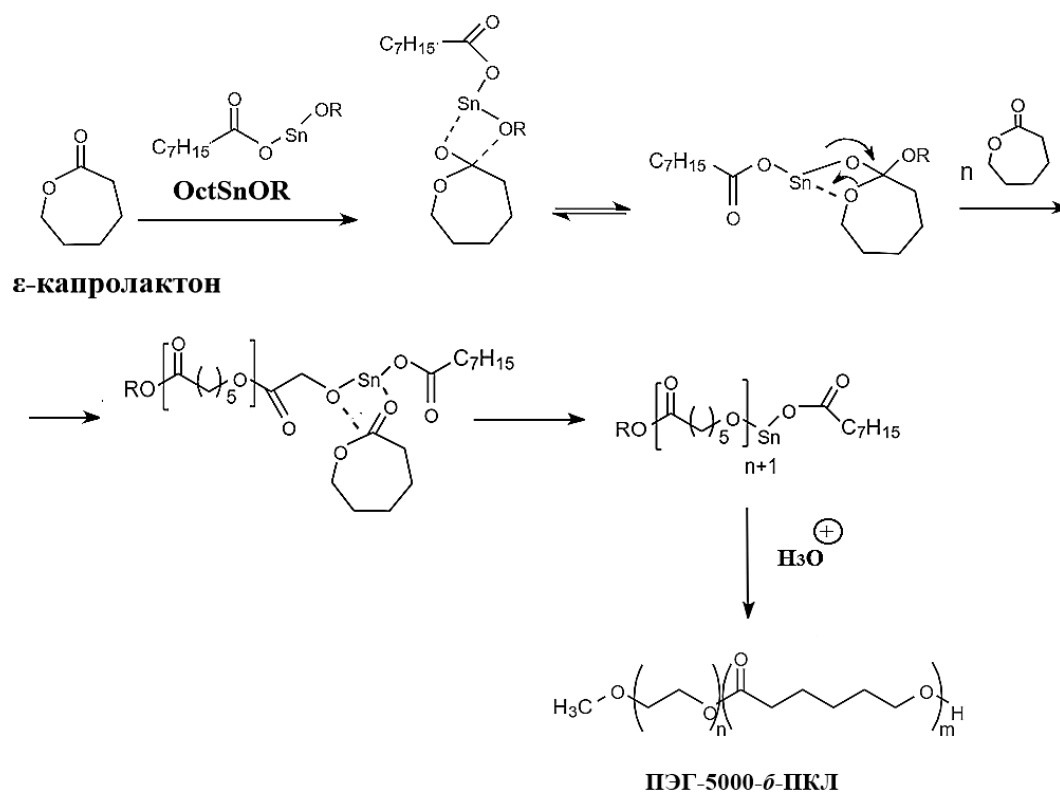


Рисунок 10. Получение сополимера ПЭГ-5000-*b*-ПКЛ полимеризацией с «раскрытием цикла».

Для получения полимерных образцов с разными молекулярными массами варьировались количество исходного мономера, отношение [мономер]:[инициатор]:[соинициатор], температура и время полимеризации.

Вследствие более гидрофобных свойств и большого времени разложения в физиологических условиях, в качестве систем доставки лекарств необходимо использовать полимеры ПКЛ и ПЭГ-5000-*b*-ПКЛ с низкой молекулярной массой. Для получения таких полимеров в реакционную смесь к мономеру и катализатору были добавлены гидроксилсодержащие соединения (соинициаторы), такие как додеканол,

метиловый эфир ПЭГ-5000 и вода. Так же как и при полимеризации лактида, использование гидроксилсодержащих соединений позволяет получить низкомолекулярные полимеры.

Таблица 2. Условия полимеризации и характеристики ПКЛ и ПЭГ-5000-б-ПКЛ

№	Образец	Катализатор, г	Соинициатор	Соинициатор: катализатор	M _w (ГПХ)	Дисперсность	Выход, %
1	ПКЛ	0.08	-	-	42 000	1,6	93
2	ПКЛ	0.08	Додеканол	2:1	42 400	1,6	93
3	ПКЛ	0.08	Додеканол	1:1	47 000	1,7	95
4	ПКЛ	0.037	-	-	69 000	1,5	95
5	ПКЛ	0.037	Додеканол	2:1	30 000	1,7	82
6	ПКЛ	0.037	Додеканол	4:1	47 000	1,6	91
7	ПЭГ-5000-б-ПКЛ	0.037	ПЭГ	200:1	29 000	1,5	88
8	ПЭГ-5000-б-ПКЛ	0.037	ПЭГ	400:1	43 000	1,6	87

Согласно данным, полученным методом ГПХ (табл. 2.), при увеличении количества катализатора (с 0,037 до 0,08 г) уменьшается молекулярная масса полимера с 69 000 до 42 000 (образцы 4 и 1), выход полимерного продукта практически не меняется и составляет 95 и 93 % соответственно. Добавление в реакционную смесь, содержащую 0,08 г катализатора, додеканола, используемого в качестве соинициатора, не влияет на молекулярную массу, дисперсность и выходы ПКЛ (образцы 1 и 2) за счет высокого содержания октоата олова. Введение 0,07 г додеканола (образец 2) не изменило молекулярную массу получаемого ПКЛ (42 400) по сравнению с образцом 1. Уменьшение же соотношения [соинициатор]: [катализатор] в образце 3, где масса додеканола составила 0,04 г, приводит к увеличению молекулярной массы полимера с 42 000 до 47 000. Но добавление соинициатора в полимеризационную смесь с количеством октоата олова 0,037 г способствует уменьшению молекулярной массы полимера при прочих равных условиях (образец 5). Поэтому для дальнейших исследований использовались катализатор массой 0,037 г и соотношение [додеканол]:[октоат олова] равное 2:1.

При сравнении образцов под номерами 2, 3, 5 и 7 можно сделать заключение, что введение додеканола или ПЭГ уменьшает молекулярную массу с 69 000 до 30 000 и 29 000 соответственно. Дисперсность повышается при добавлении соинициаторов, а выходы снижаются с 95 до 82 %. При дальнейшем повышении содержания гидроксилсодержащих соединений (в образцах 4 и 6), молекулярная масса полимера возрастает. Таким образом, была получена серия образцов с варьированием молекулярной массы от 29000 до 69000 и индексом полидисперсности от 1,5 до 1,7. Выходы полимера лежали в диапазоне от 82 до 95%

Структура и химический состав гомо- и сополимеров подтверждались методом ^1H ЯМР спектроскопии (рис.11.).

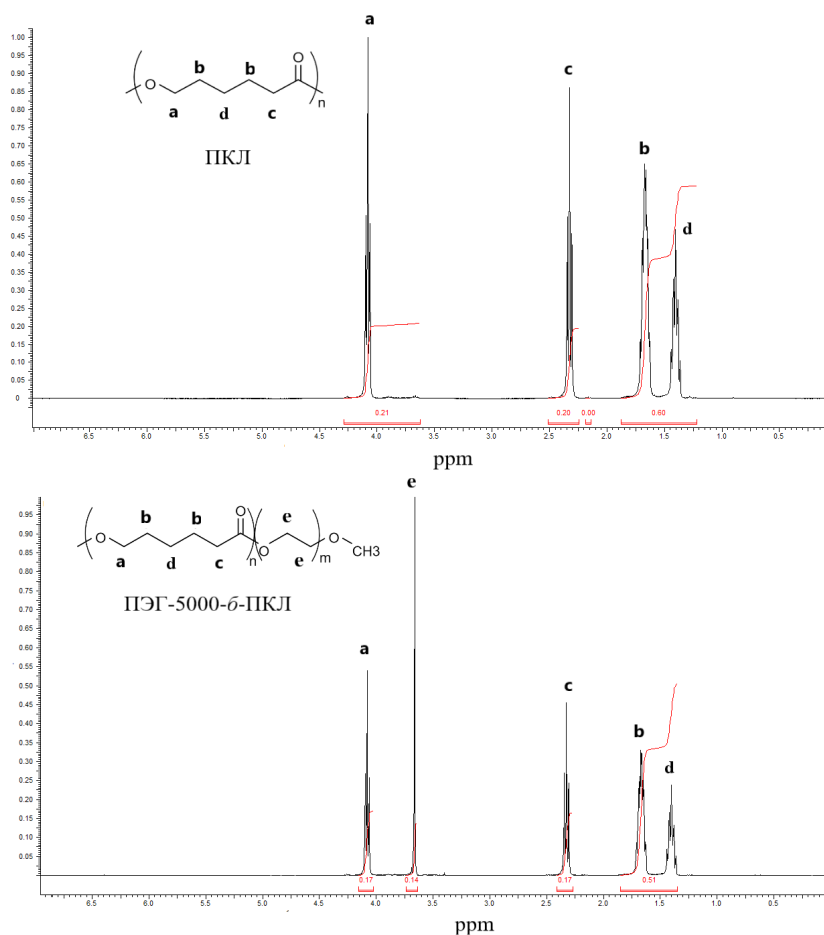


Рисунок 11. Спектр ЯМР ^1H гомополимера поли(капролактона) и сополимера поли(этиленгликоля)-5000 с поли(капролактоном).

В полученных протонных спектрах, представленных на рис.11. сигналы при 1,4 и 1.6 м.д., соответствуют протонам метильных групп ПКЛ, а сигналы при 4,2 и 2.3 м.д., относятся к протонам в метокси- и карбоксигруппы ПКЛ соответственно. На втором протонном спектре наличие ПЭГ подтверждается новым сигналом при 3.5 м.д., отвечающий за метиленовые протоны ПЭГ.

3.3. Характеристики полимерных частиц

Для получения инкапсулированных полимерных частиц со средним размером частиц от 100 до 200 нм был использован метод наноосаждения.

Органический растворитель был выбран исходя из требований растворимости в нем полимера и лекарства, степени его смешивания с водой, а также легкости удаления из системы. Исходя из этих условий, в качестве органической фазы был выбран ацетонитрил, в котором хорошо растворяется полимеры ПМК, ПКЛ и их сополимеры с ПЭГ, и который можно легко удалить из системы при перемешивании без дополнительных затрат энергии.

Подбор концентраций исходных компонентов и условий проведения реакции для формирования полимерных частиц нужного размера проходил на основании проанализированных данных из литературных источников по методу наноосаждения.

Основной движущей силой процесса наноосаждения является быстрое перенасыщение раствора в результате быстрого смешивания органической и водной фазы. Когда раствор, состоящий из гидрофобного растворенного вещества в полярном смешивающемся с водой растворителе, смешивают с большим количеством воды, концентрация растворенного вещества в полученном растворе превышает его предел термодинамической растворимости. Локальное перенасыщение гидрофобных растворенных полимерных цепей после достижения критической концентрации нуклеации приводит к самопроизвольному зародышеобразованию в виде мелких частиц с последующим их ростом. Стабильные суспензии монодисперсных полимерных наночастиц могут быть получены в узкой метастабильной области композиции тройной смеси полимер / растворитель / нерастворитель (вода) - области

Узо, расположенной между бинодальной и спинодальной кривыми, соответствующей разбавленным растворам полимеров и большому количеству воды.

За пределами области Узо происходит либо практически полное осаждение полимера в виде неконтролируемо больших агрегатов (при больших концентрациях полимера и воды и при малых органического растворителя), либо полное растворение полимера без образования пересыщенного раствора вследствие малых концентраций полимера и больших растворителя.

Также были исследованы факторы, влияющие на размеры получаемых полимерных частиц, такие как природа и концентрация исходных компонентов, скорость перемешивания полученного раствора. Из изученных литературных данных был сделан вывод, что при небольших концентрациях полимера в органической фазе (до 10 мг/мл) молекулярная масса полимера мало влияет на размеры получаемых частиц. Для получения инкапсулированных частиц с размерами от 100 до 200 нм, была изучена зависимость размеров наночастиц от концентрации полимера в ацетонитриле (рис. 12.а.). Из полученных данных можно сделать вывод, что размеры частиц увеличивается (с 40 нм до 120 нм) с ростом концентрации полимера (от 0,5 до 10 мг/мл) за счет увеличения вязкости раствора. Оптимальная концентрация полимера составила 5 мг/мл с размерами частиц 80 нм.

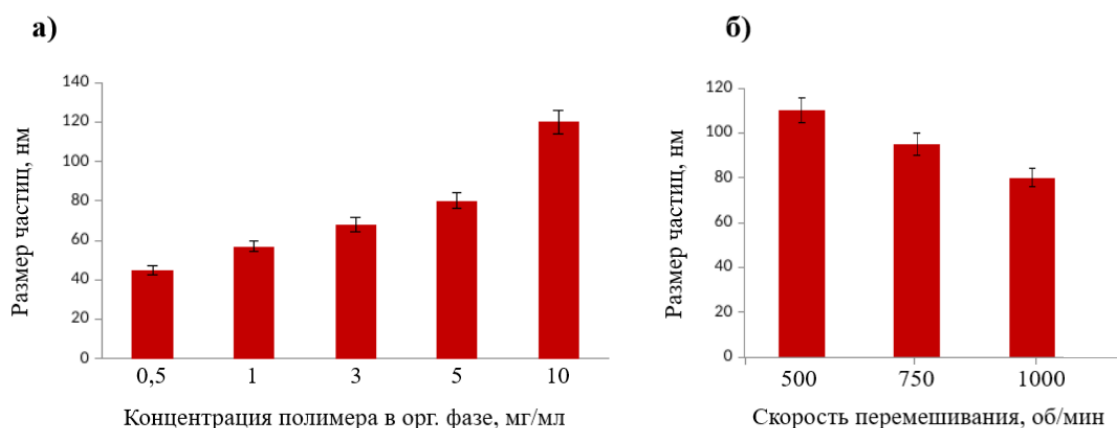


Рисунок 12. Зависимость размера наночастиц от концентрации полимера в органической фазе (а) и от скорости перемешивания (б).

В методе наноосаждения гомогенное пересыщение требует, чтобы смешивание водной и органической фаз и связанная с этим молекулярная диффузия компонентов были чрезвычайно быстрыми по сравнению со скоростью нуклеации наночастиц для получения частиц с маленьким размерами. Поэтому также была изучена зависимость размера частиц от скорости перемешивания раствора. Из представленных данных на рис. 12.б. размеры ПЧ уменьшаются со 110 до 90 нм с увеличением скорости перемешивания от 500 до 1000 об/мин. Таким образом, чтобы получить частицы с оптимальными размерами (100 нм), использовалась скорость 750 об/мин.

Далее, используя трехкомпонентную фазовую диаграмму полимер/растворитель/вода, представленную на рис. 13., был рассчитан необходимый состав исходных компонентов, при котором система будет находиться в области Узо, что приводит к образованию стабильных наноразмерных частиц. Таким образом, в рамках исследования было использовано массовое соотношение полимер/ацетонитрил/вода: 0,08 %/16,7 %/83,2 % соответственно, лежащее в области Узо. Процесс наноосаждения проводился при использовании раствора полимера с концентрациями 5 мг/мл и с соотношением водной фазы к органической 5:1.

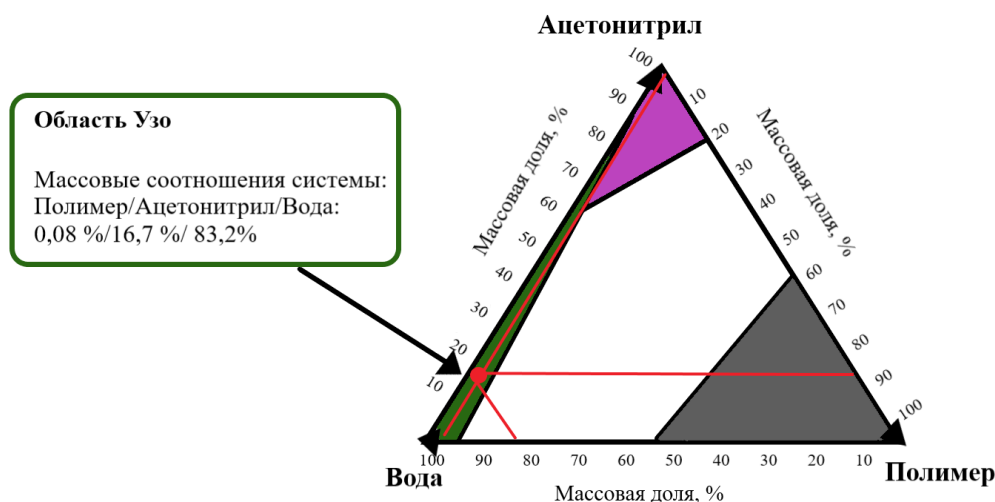


Рисунок 13. Трехкомпонентная фазовая диаграмма полимер/органический растворитель/вода с указанием используемых в данной работе массовых соотношений исходных компонентов.

Предварительно до инкапсулирования диоксидэта в полимерные носители были получены нативные частицы для оценки среднего размера, дзета-потенциала и

стабильности суспензии полимерных наночастиц в водной фазе методом динамического рассеяния света.

В методе ДРС флуктуации интенсивности рассеянного света измеряется как функция движения (диффузии) наночастиц. Более быстрая диффузия наночастиц приводит к быстрым флуктуациям в рассеянном свете. Эти флуктуации затем измеряются счетчиком фотонов и коррелируют с коэффициентом диффузии наночастиц (гидродинамический размер частиц), применяя уравнения Стокса-Эйнштейна.

Несмотря на то, что метод ДРС является широко используемым и быстрым способом определения гидродинамического радиуса и потенциала частиц, в представляемом исследовании также использовали альтернативный метод: анализ траектории частиц (АТЧ), в основе которого лежат свойства рассеивания света и броуновского движения, что позволяет получать распределение частиц по размерам. Благодаря возможности наблюдения за суспензией частиц через микроскоп с 20-кратным увеличением, на котором установлена камера, можно отслеживать каждую частицу отдельно и рассчитывать гидродинамические размеры.

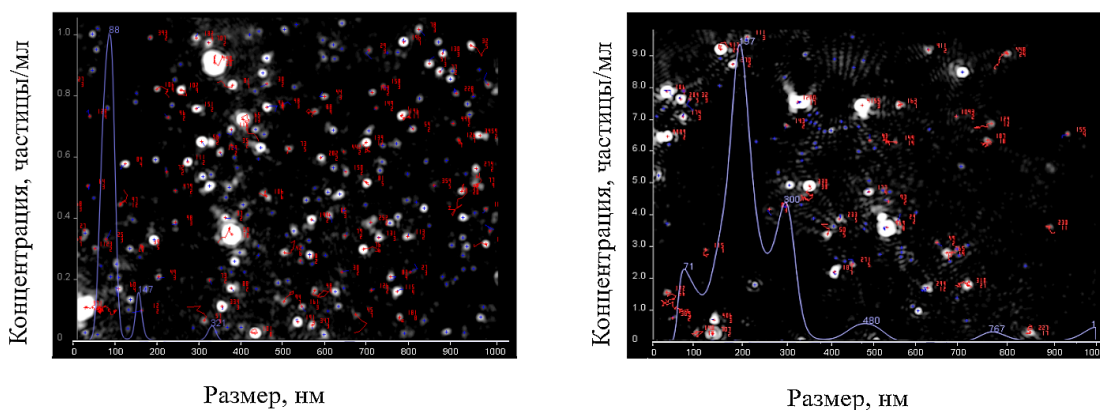


Рисунок 14. Кадр видеозаписи рассеяния света на индивидуальных наночастицах, полученный методом анализа траектории частиц.

На рис. 14. представлены типичные картины рассеяния излучения на нативных наночастицах ПЭГ-5000-*б*-ПМК с размерами 90 нм (**а**) и микрочастиц ПЭГ-5000-*б*-ПМК с размерами 305 нм (**б**), получаемые методом анализа траекторий частиц (кадр из видеозаписи).

Дзета-потенциал (ζ - потенциал) описывает степень агрегативной устойчивости суспензии ПЧ. Чем выше абсолютное значение ζ - потенциала - тем больше величина заряда на поверхности частиц, за счет чего происходит повышение электростатического отталкивания между частицами с одинаковым зарядом. Частицы на основе поли(капролактона) и поли(молочной кислоты) приобретают заряд за счет поверхностной диссоциации карбоксильных групп ПМК и ПКЛ в воде с образованием отрицательно заряженных карбоксилат-ионов. На устойчивость (или значение ζ - потенциала) влияет наличие электролитов, изменение pH, температуры среды и концентрации раствора. Также стабильность частиц зависит от наличия поли(этиленгликолевого) фрагмента в полимерах. Хотя его присутствие может понижать абсолютное значение дзета-потенциала за счет уменьшения доли концевых карбоксильных групп, ПЭГ повышает стабильность ПЧ в воде благодаря стерическому отталкиванию гидрофильных блоков ПЭГ на поверхности частиц, когда как блок гидрофобных ПМК или ПКЛ находится во внутренней части частицы.

В табл.3. представлены значения размера и дзета-потенциала нативных полимерных контейнеров, полученные методами ДРС и АТЧ.

Таблица 3. Характеристики полимерных наночастиц.

№	Полимер	$M_w \cdot 10^3$	Размер, нм (ДРС)	PdI	ζ -потенциал, мВ	Размер, нм (АТЧ)	Выход, %
1	ПМК	26	91	0,07	$-33,0 \pm 4,2$	$90,8 \pm 0,8$	82
2	ПМК	38	96	0,08	$-32,8 \pm 5,1$	$88,0 \pm 1,2$	90
3	ПЭГ-5000-б-ПМК	34	90	0,07	$-25,4 \pm 5,8$	$91,6 \pm 1,3$	92
4	ПКЛ	30	135	0,22	$-27,4 \pm 6,2$	$128,1 \pm 1,8$	60
5	ПЭГ-5000-б-ПКЛ	29	76	0,12	$-21,2 \pm 4,9$	$70,4 \pm 1,5$	65

Из полученных данных можно сделать вывод, что размер полимерных наночастиц, полученных методом наноосаждения, находится в диапазоне от 90 и 96 нм для частиц на основе ПМК, 90 нм для частиц на основе ПЭГ-5000-б-ПМК, 135 нм для частиц на основе ПКЛ и 76 нм для частиц из ПЭГ-5000-б-ПКЛ. Наночастицы на основе гомополимера ПМК и сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК характеризуются низкими значениями индекса полидисперсности (0,07-0,08), унимодальным распределением по размерам (рис.16.) и высокими выходами в диапазоне от 82 до 92

%. Введение ПЭГ уменьшает размер частиц за счет образования компактной структуры «ядро-оболочка», в которой гидрофобный полимер (ПМК или ПКЛ) «сжимается» в водной среде внутри образованных частиц, а гидрофильный блок ПЭГ располагается на поверхности, увеличивая стабильность полимерных носителей и препятствуя дальнейшему росту частиц.

Значения размеров частиц, полученные методом АТЧ, находятся в диапазоне от 71 нм для ПЭГ-5000-б-ПКЛ до 128 нм для ПКЛ. Размеры наночастиц, полученные методом ДРС, немного больше, чем размеры, полученные методом АТЧ, так как метод АТЧ дает более точные результаты за счет возможности анализа каждой частицы в суспензии отдельно, а в методе ДРС результаты усредняются по всему количеству частиц, и если в суспензии присутствует небольшая фракция крупных частиц, то средний размер смещается в сторону больших размеров. Но в данном случае результаты, полученные обоими методами, хорошо коррелируют между собой, что представлено на рис. 15..

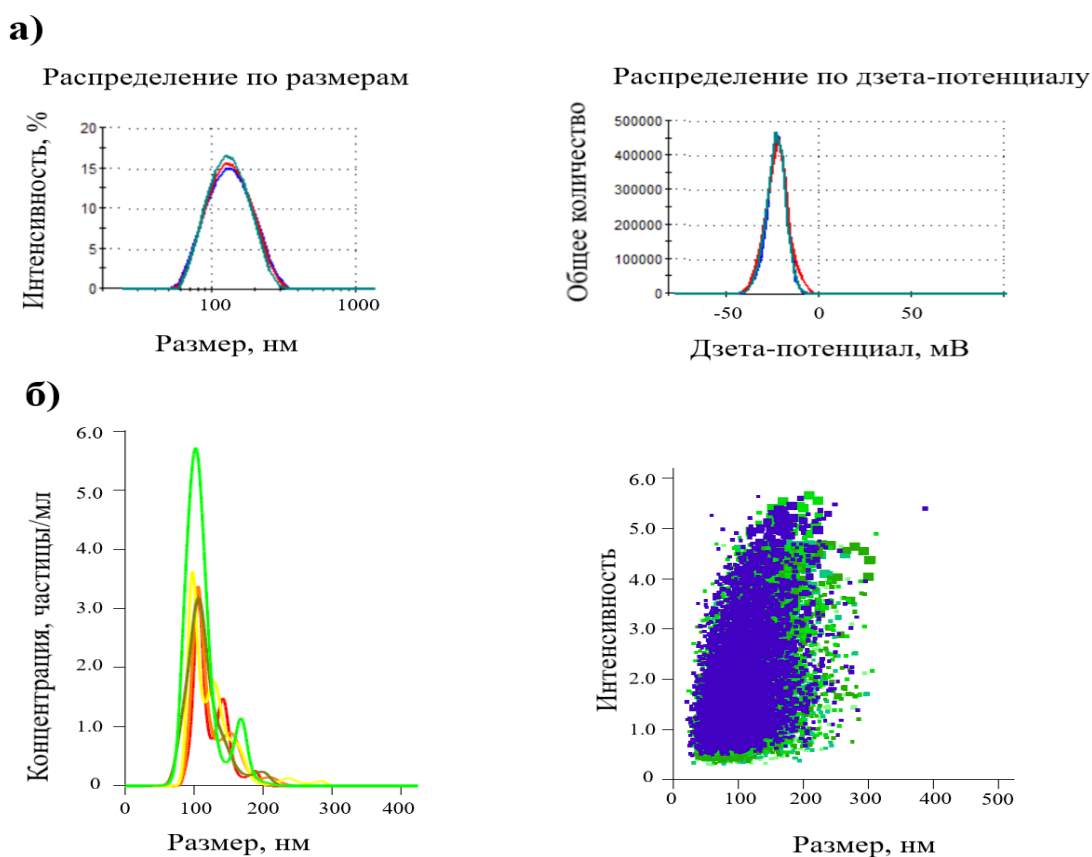


Рисунок 15. Распределение по размерам и дзета-потенциалу частиц на основе ПЭГ-5000-б-ПМК, проанализированные методами ДРС (**а**) и АТЧ (**б**).

Уменьшение размера частиц на основе блок-сополимера ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ (до 76 нм) может объяснено более гидрофобной природой ПКЛ, приводящей к более плотной упаковке наночастиц в воде. Также для частиц из ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ и ПКЛ наблюдается увеличения индекса полидисперсности (0,12 и 0,22 соответственно) и снижение выходов (65 % и 60 %). К увеличению Pdl приводит образование агрегатов частиц с размерами в районе 300-400 нм за счет уменьшения стабильности частиц из ПКЛ в водной среде (рис. 16.). Уменьшение выхода связано с осаждением полимера во время процесса образования частиц методом наноосаждения. Таким образом, можно сделать вывод, что частицы на основе сополимера ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ и гомополимера ПКЛ с молекулярной массой более 30 000 могут быть неустойчивы в водной среде.

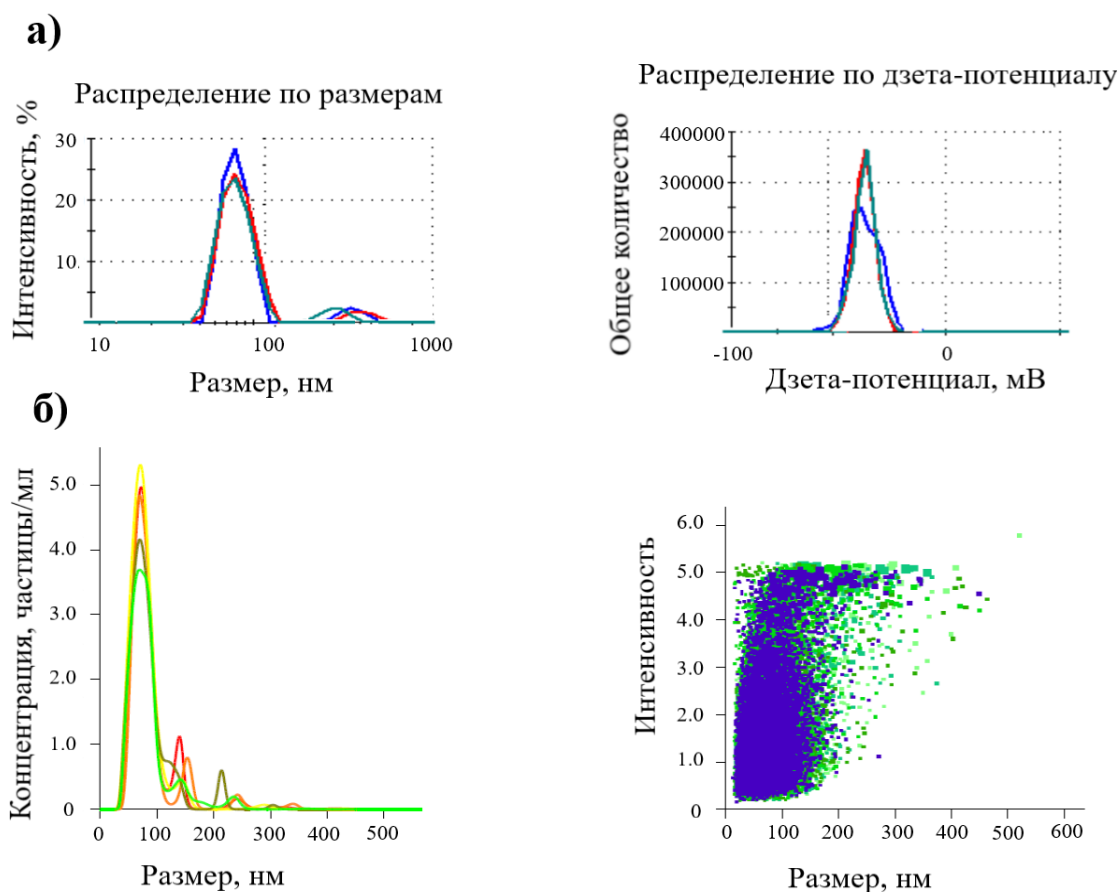


Рисунок 16. Распределение по размерам и дзета-потенциалу частиц на основе ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ, полученные методами ДРС (**а**) и АТЧ (**б**).

Все полученные полимерные частицы имеют отрицательное значение дзета-потенциала за счет диссоциирующих карбоксильных групп ПМК и ПКЛ. Значение дзета-потенциала варьируется от -21 до -33 мВ. Введение ПЭГ в состав сополимера приводит к уменьшению абсолютного значения дзета-потенциала с 33 до 25 мВ за счет уменьшения количества поверхностных карбоксильных групп, при этом стабильность частиц в присутствии звеньев ПЭГ не снижается. Частицы на основе ПЭГ-5000-б-ПКЛ имеют самое низкое абсолютное значение дзета-потенциала (-21 мВ) за счет гидрофобности ПКЛ и наличия фрагментов ПЭГ.

3.4. Характеристики инкапсулированных полимерных частиц, полученных методом наноосаждения

Инкапсулированные диоксадэтом наночастицы были получены методом наноосаждения. Перед вводом в водную фазу раствор полимера с концентрацией 5 мг/мл смешивали с раствором диоксадэта в ацетонитриле и оставляли на 1 час перемешиваться. Далее полученную органическую фазу вводили в водную и оставляли систему при перемешивании на 24 часа для удаления органического растворителя. Ацетонитрил был выбран на основе его смешиваемости с водой, возможности легкого удаления из системы и растворимости в нем как полимеров, так и диоксадэта. Также был использован в качестве органической фазы другой летучий растворитель - тетрагидрофуран, но при анализе методом ДРС инкапсулированных частиц были получены недостоверные данные, а также значения выхода полимерных контейнеров были значительно ниже, поэтому было решено использовать только ацетонитрил.

Была изучена зависимость стабильности и размеров частиц, а также эффективности инкапсулирования и загрузки препарата от начального количества вводимого диоксадэта (1, 3 и 6 мг), а также от природы и молекулярной массы полимера (табл. 4.). Все полученные полимерные частицы имеют отрицательное значение дзета-потенциала за счет диссоциирующих карбоксильных групп ПМК и ПКЛ. Значение дзета-потенциала варьируется от -19 до -38 мВ для частиц на основе ПМК и ПЭГ-5000-б-ПМК, и от -16 до -28 мВ для частиц из ПКЛ и ПЭГ-5000-б-ПКЛ.

Абсолютное значение дзета-потенциала для частиц на основе поли(капролактона) ниже, чем у частиц из ПМК. Это может быть объяснено ухудшением стабильности в водной среде за счет увеличения количества гидрофобных блоков ПКЛ, что приводит к увеличению гидрофобных свойств получаемых на его основе наночастиц. Введение ПЭГ, как уже было сказано, уменьшает абсолютный заряд дзета-потенциала, но не уменьшает стабильности суспензии частиц.

Таблица 4. Характеристики инкапсулированных диоксидэтом наночастиц.

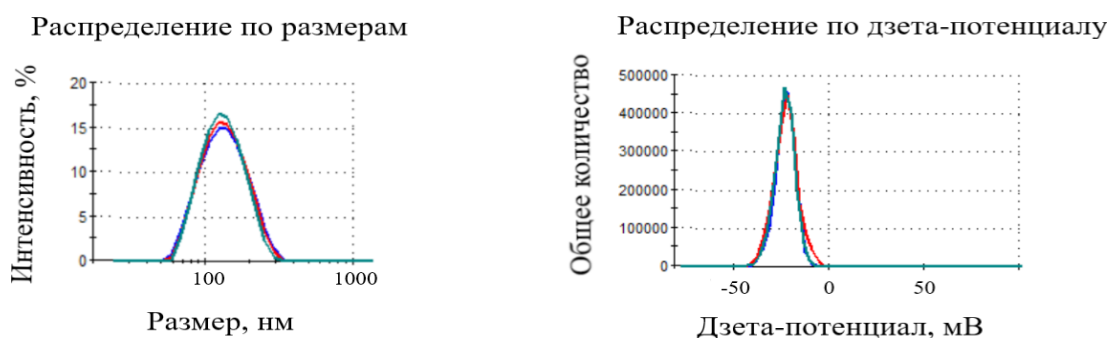
Полимер	Mw*10 ³	Начальное количество диоксидэта, мг	Размер, нм (ДРС)	PdI	ξ-потенциал, мВ	Размер, нм (АТЧ)	Выход, %
ПМК	7,0	1	118	0,07	-29,6 ± 6,3	109,9 ± 1,6	92
		3	131	0,13	-28,5 ± 6,2	120,3 ± 4,1	86
		6	143	0,08	-37,7 ± 7,8	132,4 ± 4,2	88
ПМК	26,0	1	107	0,08	-31,9 ± 6,7	103,6 ± 1,7	90
		3	141	0,11	-27,7 ± 5,3	125,6 ± 5,9	60
		6	148	0,06	-28,6 ± 7,3	132,2 ± 2,8	36
ПЭГ-5000-б-ПМК	34,0	1	133	0,06	-23,8 ± 5,2	115,9 ± 3,7	87
		3	114	0,07	-24,3 ± 5,8	98,2 ± 5,5	78
		6	144	0,05	-20,2 ± 4,6	134,8 ± 3,3	86
ПЭГ-5000-б-ПМК	66,8	1	106	0,1	-27,3 ± 6,6	92,9 ± 10,0	70
		3	114	0,13	-28,4 ± 6,9	97,5 ± 7,8	95
		6	147	0,15	-19,8 ± 5,4	126,3 ± 8,1	59
ПЭГ-5000-б-ПМК	160	1	96	0,09	-19,0 ± 5,6	115,1 ± 3,1	85
		3	142	0,13	-27,1 ± 7,4	134,7 ± 5,3	86
ПКЛ	30,1	1	167	0,15	-16,3 ± 4,6	153,2 ± 6,9	64
		3	-	-	-	-	-
ПЭГ-5000-б-ПКЛ	29,2	1	95	0,28	-16,9 ± 4,8	85,1 ± 2,1	60
		3	90	0,27	-20,9 ± 5,1	88,4 ± 1,8	46
		6	170	0,36	-13,5 ± 4,1	148,5 ± 9,6	56
ПЭГ-5000-б-ПКЛ	42,5	1	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-

Анализ размера и ξ-потенциала инкапсулированных наночастиц проводился методами ДРС и АТЧ (рис. 17.) Частицы на основе гомополимера ПМК и сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК характеризуются унимодальным распределением по размерам. Размер полученных частиц варьируется от 90 до 170 нм с индексом

полидисперсности от 0,05 до 0,15 для частиц на основе ПМК и ПЭГ-5000-*б*-ПМК и от 0,15 до 0,37 для частиц на основе ПКЛ и ПЭГ-5000-*б*-ПКК.

Также были проведены исследования размеров наночастиц методом АТЧ. Значения размеров полимерных частиц, полученных методом АТЧ незначительно меньше, чем размеры, полученные методом ДРС, и находятся в диапазоне от 110 до 150 нм для гомополимеров ПМК и ПКЛ и в диапазоне от 85 до 135 нм для сополимеров ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ и ПЭГ-5000-*б*-ПМК. Но тенденции, которые были изучены для результатов ДРС, наблюдается и для АТЧ.

а)



б)

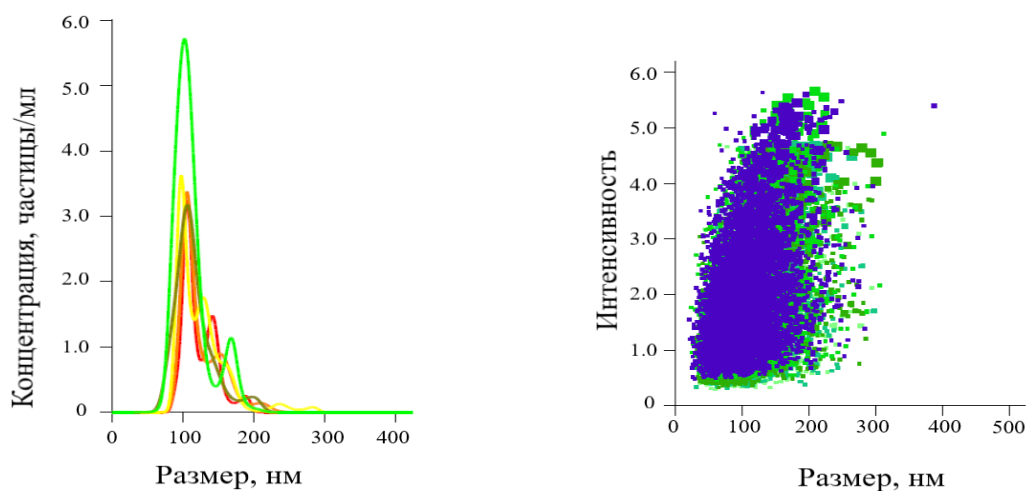


Рисунок 17. Распределение по размерам и дзета-потенциалу инкапсулированных частиц на основе ПЭГ-5000-*б*-ПМК (начальное количество диоксидэта 1 мг), полученные методами ДРС **(а)** и АТЧ **(б)**.

Увеличение полидисперсности для поли(капролактоновых) частиц объясняется наличием небольшого количества агрегатов с размерами в районе 400-500 нм (рис. 18.). Данные агрегаты появляются за счет уменьшения стабильности более

гидрофобных частиц. Также частицы на основе ПКЛ и его сополимера характеризуются меньшими выходами (в диапазоне от 46 до 64 %) в сравнении с частицами на основе ПМК и ПЭГ-5000-*б*-ПМК (от 59 до 90 %). Низкие выходы поли(капролактоновых) частиц и ПЧ на основе ПМК (массой 26 000) и ПЭГ-5000-*б*-ПМК (с массой 66 800) с 6 мг диоксадэа (56 %, 36 % и 59 % соответственно) связаны с осаждением полимерных цепей с большей длиной в водной среде в процессе получения частиц из-за увеличения количества вводимого гидрофобного препарата.

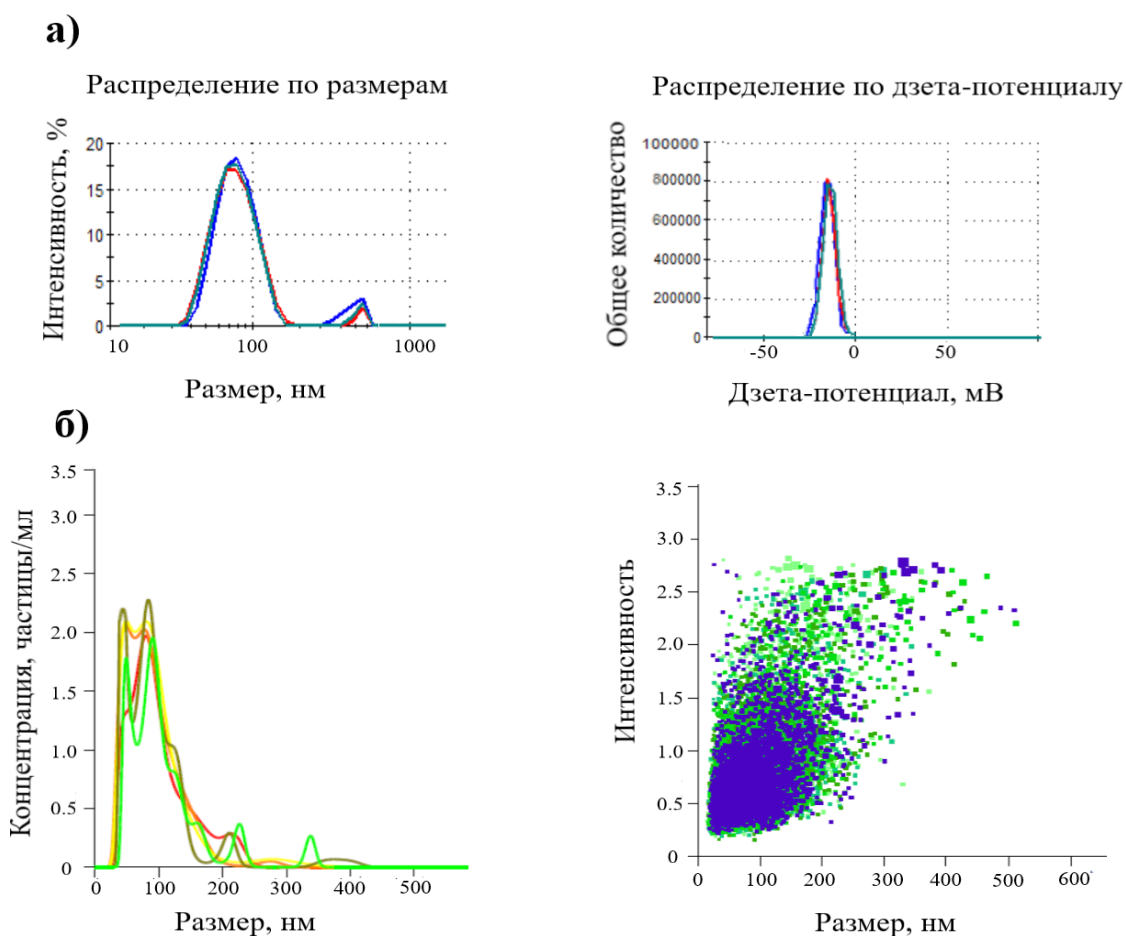


Рисунок 18. Распределение по размерам и дзета-потенциалу инкапсулированных частиц на основе ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ (начальное количество диоксадэа 1 мг), полученные методами ДРС (**а**) и АТЧ (**б**).

Также было изучено влияния блока ПЭГ на размер частиц. Из полученных данных установлено, что добавление ПЭГ уменьшает размеры получаемых частиц, за счет образования более плотной структуры “гидрофобное ядро - гидрофильная

оболочка” и повышения стабильности, препятствующей агрегации частиц. Особенно это заметно для частиц на основе ПКЛ.

Частицы на основе гомополимера ПКЛ имеют размер 167 нм при загрузке 1 мг диоксидэ, дальнейшая же загрузка 3 и 6 мг препарата невозможна из-за осаждения полимера при процессе наноосаждения. Присутствие же ПЭГ в блок-сополимере ПЭГ-5000-б-ПКЛ уменьшает размер частиц до 90 нм и позволяет загрузить большие количества диоксидэ в поли(капролактоновые) частицы. Но использование сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ с молекулярной массой более 30 000 в качестве основы для получения ПЧ методом наноосаждения невозможно из-за осаждения гидрофобного полимера в данных условиях.

Также из представленных данных можно сделать вывод, что молекулярная масса слабо влияет на размер получаемых наночастиц. В основном на размер частиц влияет количества инкапсулированного диоксидэ. Увеличение количества загружаемого препарата приводит к увеличению среднего размера частиц (рис. 19.).

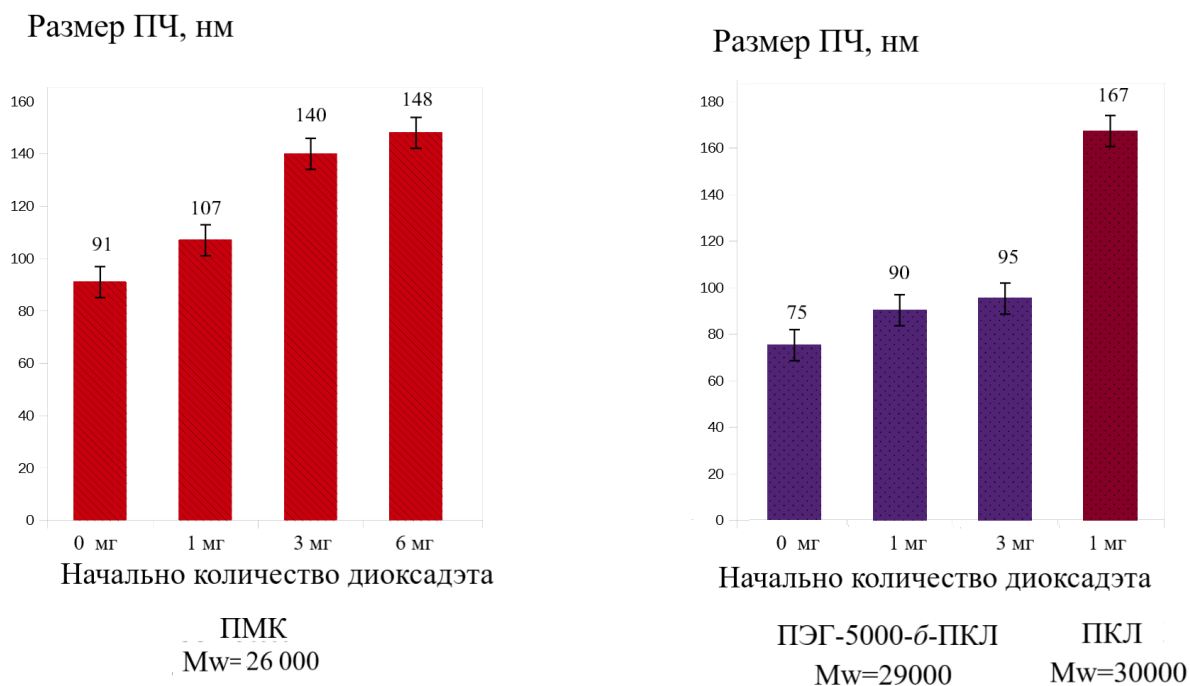


Рисунок 19. Зависимость размера наночастиц от количества загружаемого препарата.

3.5. Характеристики полимерных микрочастиц

Для получения полимерных частиц в диапазоне размеров от 300 до 700 нм был использован метод одинарной эмульсии (тип масло-в-воде). Метод одинарной эмульсии основан на образовании мелких капель масла (растворенного в органической фазе полимера), диспергированных в непрерывной водной фазе, причем каждая капля масла окружена защитным покрытием из поверхностно-активных веществ (ПАВ), которые дополнительно стабилизируют эмульсию за счет уменьшения межфазного натяжения на поверхности раздела фаз капли дисперсной фазы. Выбор данного метода основывается на возможности инкапсулирования гидрофобного лекарственного препарата внутрь гидрофобных полимерных частиц. В качестве органической фазы использовался хлористый метилен за счет растворимости в нем и используемых полимеров, и лекарственного препарата. Также данный растворитель имеет плохую смешиваемость с водой. В роли ПАВ выступали водный раствор 0,2% SDS и 1% лутрола, а также 1% водный раствор ПВС. Поли(виниловый спирт) был введен в систему для увеличения вязкости раствора, что позволяло увеличивать размеры получаемых частиц.

Процесс образования частиц методом одинарной эмульсии заключался в смешении неполярного органического растворителя, в котором растворены полимер и лекарственное средство с водной фазой, содержащей ПАВ при постоянном перемешивании и обработке ультразвуком. После образования стабильной эмульсии органический растворитель удаляли, используя роторный испаритель. После испарения органического растворителя с поверхности капель концентрация полимера увеличивается, достигая критической точки, при которой концентрация полимера превышает его растворимость в органической фазе, что приводит к осаждению полимера с образованием микрочастиц.

На первом этапе методом одинарной эмульсии были получены нативные частицы на основе ПЭГ-5000-*б*-ПМК. Размер и дзета-потенциал были измерены методом ДРС. Также полученные частицы были проанализированы методом АТЧ. Размер, установленный методом ДРС равен 305 нм с индексом полидисперсности 0,42

и дзета-потенциалом -25 мВ. Большое распределение по размерам объясняется наличием нескольких фракций частиц с разными размерами, наличие которых можно установить анализируя интенсивность пиков, полученных в ходе измерения размеров методом АТЧ. На рис. 20. представлена зависимость концентрации частиц от размеров, на которой можно видеть наличие трех пиков: в районе 200, 260 и 550 нм.

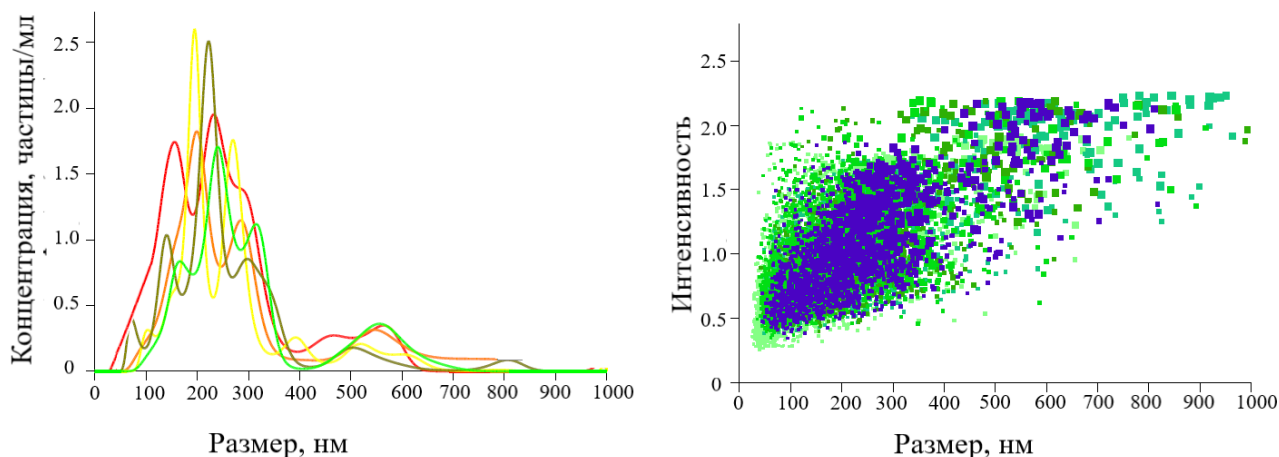


Рисунок 20. Распределение по размерам полимерных частиц на основе ПЭГ-5000-б-ПМК, полученные методами АТЧ.

Далее методом одинарной эмульсии были получены частицы с инкапсулированным лекарственным веществом (начальное количество загружаемого диоксидэта: 1 и 3 мг).

Размер и дзета-потенциал полученных микрочастиц были исследованы методом ДРС и АТЧ. Частицы, полученные методом одинарной эмульсии, имели достаточно широкое распределение по размерам. Частицы крупной фракции были выделены после проведения процедуры центрифугирования и осаждения, для контейнеров мелкой фракции, которые остались в надосадочном растворе, проводили процедуру диализа с целью удаления неинкапсулированного лекарственного препарата, ПАВ и поливинилового спирта.

Частицы мелкой фракции имели размеры в диапазоне от 165 до 220 нм и дзета-потенциал от -24 до -34 мВ. Размер частиц крупной фракции лежал в диапазоне от 340 до 700 нм с индексом полидисперсности от 0,26 до 0,6, дзета-потенциал варьировался от -25 до -30 мВ (табл. 5.).

Таблица 5. Характеристики микрочастиц (крупная фракция), инкапсулированных диоксадэтом.

Полимер	Mw*10 ³	Начальное количество диоксадэта, мг	Размер, нм (ДРС)	PdI	ξ-потенциал, мВ	Размер, нм (АТЧ)	Выход, %
ПМК	7	1	340	0,26	-31,8 ± 5,8	323,6 ± 6,3	53
		3	370	0,35	-27,1 ± 5,2	338,2 ± 7,8	28
ПЭГ-5000-б-ПМК	34	1	316	0,29	-29,7 ± 6,1	282,0 ± 13,1	38
		3	393	0,41	-29,5 ± 6,0	325,6 ± 6,2	52
ПКЛ	30,1	1	500	0,41	-25,2 ± 5,7	423,7 ± 5,5	36
ПКЛ		3	706	0,67	-27,4 ± 5,1	628,5 ± 20,3	34
ПЭГ-5000-б-ПКЛ	29,2	1	252	0,35	-28,0 ± 4,9	225,6 ± 4,3	9
		3	287	0,29	-26,9 ± 4,7	247,7 ± 20,5	40

Сравнивая результаты, полученные методом ДРС, можно увидеть, что частицы на основе гомополимера ПМК имеют размеры от 340 до 370 нм, размеры же частиц на основе более гидрофобного ПКЛ находятся в диапазоне от 500 до 700 нм. При введении блока ПЭГ размер поли(капролактоновых) частиц уменьшается до 250-290 нм, также уменьшается и индекс полидисперсности.

В табл. 6. представлены результаты анализа размеров и дзета-потенциала частиц мелкой фракции. Размер частиц на основе ПМК и его сополимера находится в диапазоне от 210 до 220 нм, размер частиц на основе ПКЛ и его сополимера с ПЭГ в 170-180 нм.

Таблица 6. Характеристики инкапсулированных диоксадэтом микрочастиц (мелкая фракция).

Полимер	Mw*10 ³	Начальное количество диоксадэта, мг	Размер, нм (ДРС)	PdI	ξ-потенциал, мВ	Размер, нм (АТЧ)	Выход, %
ПМК	7	1	213	0,28	-26,6 ± 5,7	140,7 ± 2,8	44
ПЭГ-5000-б-ПМК	34	1	210	0,22	-24,4 ± 3,2	161,2 ± 2,0	44
		3	223	0,29	-30,8 ± 6,3	191,1 ± 1,7	41
ПКЛ	30,1	1	181	0,19	-26,9 ± 5,9	163,4 ± 7,6	60
ПЭГ-5000-б-ПКЛ	29,2	1	171	0,22	-25,1 ± 5,4	163,8 ± 4,3	70

Из полученных методом ДРС данных установлено, что размер частиц зависит от количества загружаемого препарата, и увеличивается с ростом количества инкапсулированного диоксадэа (рис.21.).

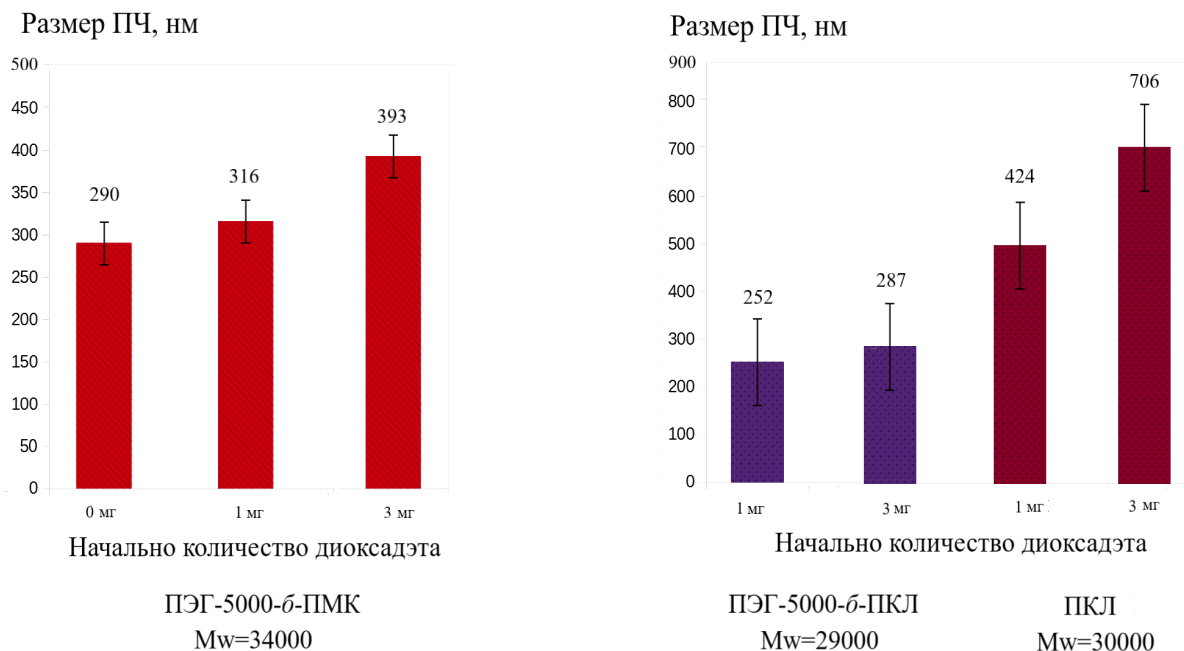


Рисунок 21. Зависимость размера частиц крупной фракции, полученных методом одинарной эмульсии, от количества загружаемого препарата.

На рис. 21. показано, что увеличение количества загружаемого препарата сильно увеличивает размер частиц (с 420 до 700 нм) только для частиц на основе гидрофобного ПКЛ. Для частиц на основе амфифильных блок-сополимеров изменения размеров при увеличении количества препарата происходят в районе 80 нм для ПЭГ-5000-б-ПМК и в районе 30 нм для ПЭГ-5000-б-ПКЛ, что связано с увеличением стабильности частиц за счет наличия в составе полимера ПЭГ.

Размеры частиц, полученные методом АТЧ, находятся в диапазоне от 230 до 340 нм для крупной фракции и от 140 до 190 нм для мелкой фракции.

Используя метод АТЧ можно детально проанализировать все присутствующие фракции частиц по интенсивности пиков, представленные на графиках распределения по размерам. Анализ данных о размерах частиц крупной фракции на основе ПКЛ

(рис. 22.) демонстрирует, что значения, полученные методами ДРС и АТЧ отличаются на 80 нм (500 и 424 нм соответственно). Это связано с тем, что в приведенном образце присутствуют 3 фракции частиц с размерами 240, 484 и 775 нм. Самый интенсивный пик у фракции 240 нм, самый слабый у фракции 775 нм.

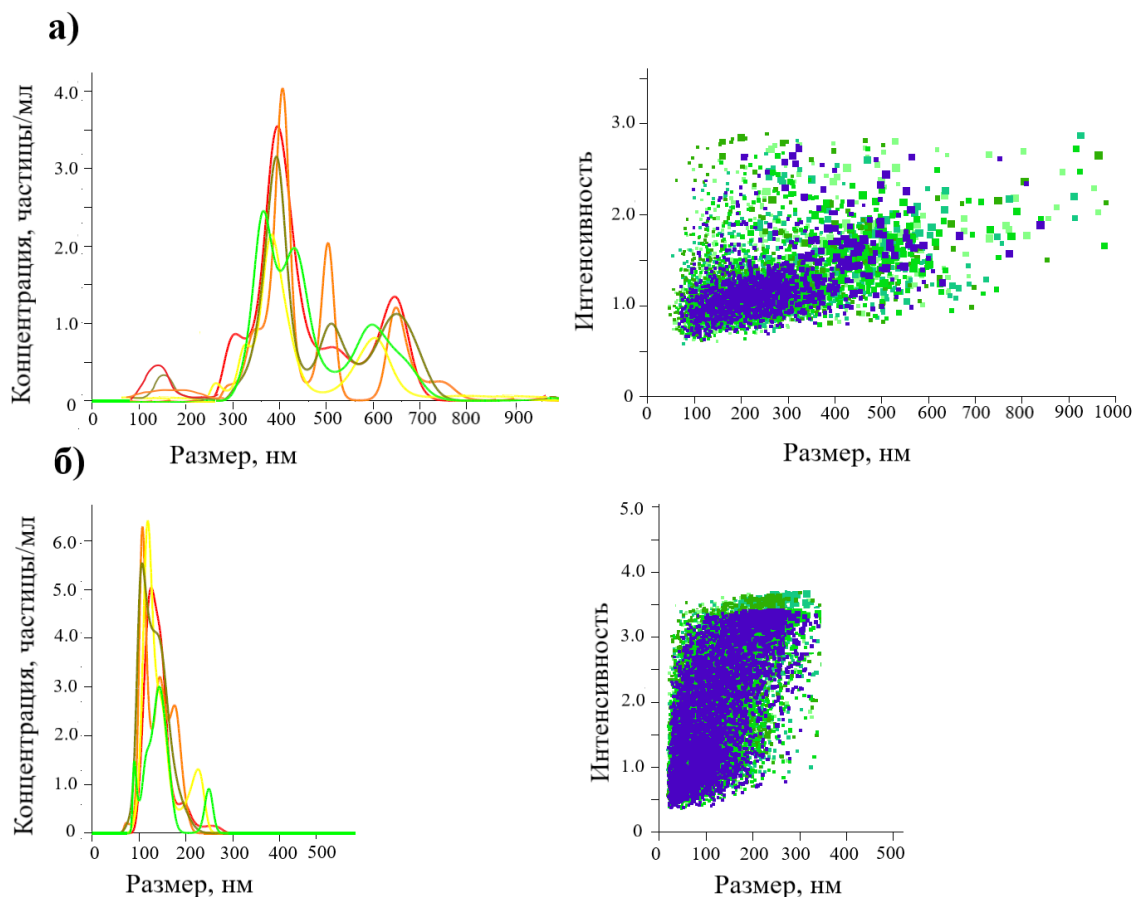


Рисунок 22. Распределение по размерам инкапсулированных частиц крупной фракции **(а)** и мелкой фракции **(б)** на основе ПКЛ, полученные методами АТЧ. Начальное количество диоксида 1 мг.

В методе ДРС произошло усреднение размеров по всем фракциям в большую сторону, в методе же АТЧ видно, что в основном в этой фракции преобладают частицы с размерами в районе 240-400 нм.

Также, например, можно наблюдать, что крупная фракция частиц на основе ПЭГ-5000-б-ПКЛ, содержит три выраженные фракции с размерами 180, 240 и 310 нм, когда как размер, выданный ДРС 250 нм (рис. 23.). Мелкая же фракция частиц характеризуется узким распределением по размерам.

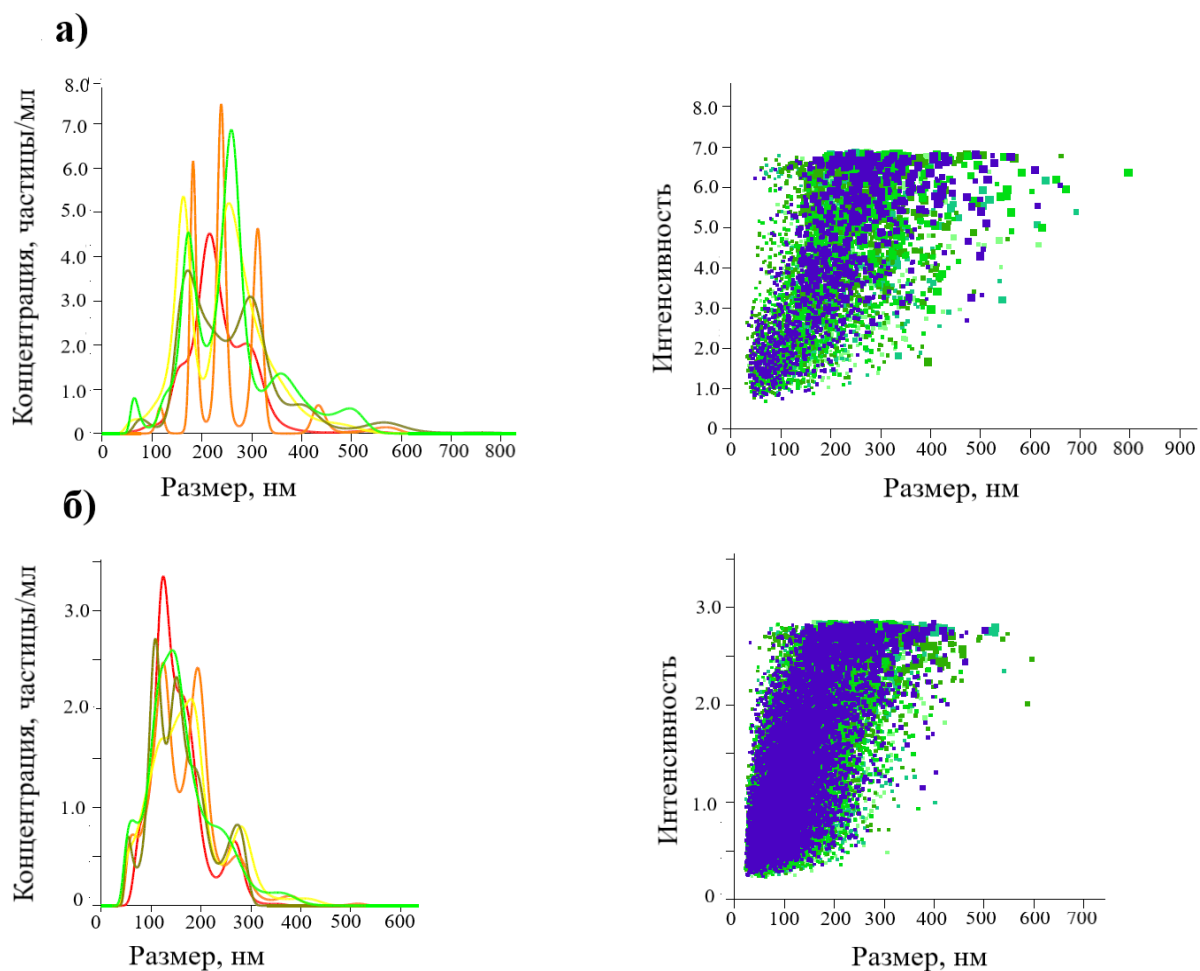


Рисунок 23. Распределение по размерам инкапсулированных частиц крупной фракции **(а)** и мелкой фракции **(б)** на основе ПЭГ-5000-б-ПКЛ, полученные методами АТЧ. Начальное количество диоксадэта 1 мг.

Также для частиц мелкой фракции на основе ПЭГ-5000-б-ПМК (3 мг диоксадэта) методом ДРС получены результаты в виде 210 нм, а в методе АТЧ можно наблюдать 3 пика: первый в районе 150 нм, второй в районе 220 нм, третий при 260 нм. (рис. 24.).

Частицы на основе ПЭГ-5000-б-ПМК мелкой фракции имеют размер в районе 160 нм и характеризуются более узким распределению по размерам..

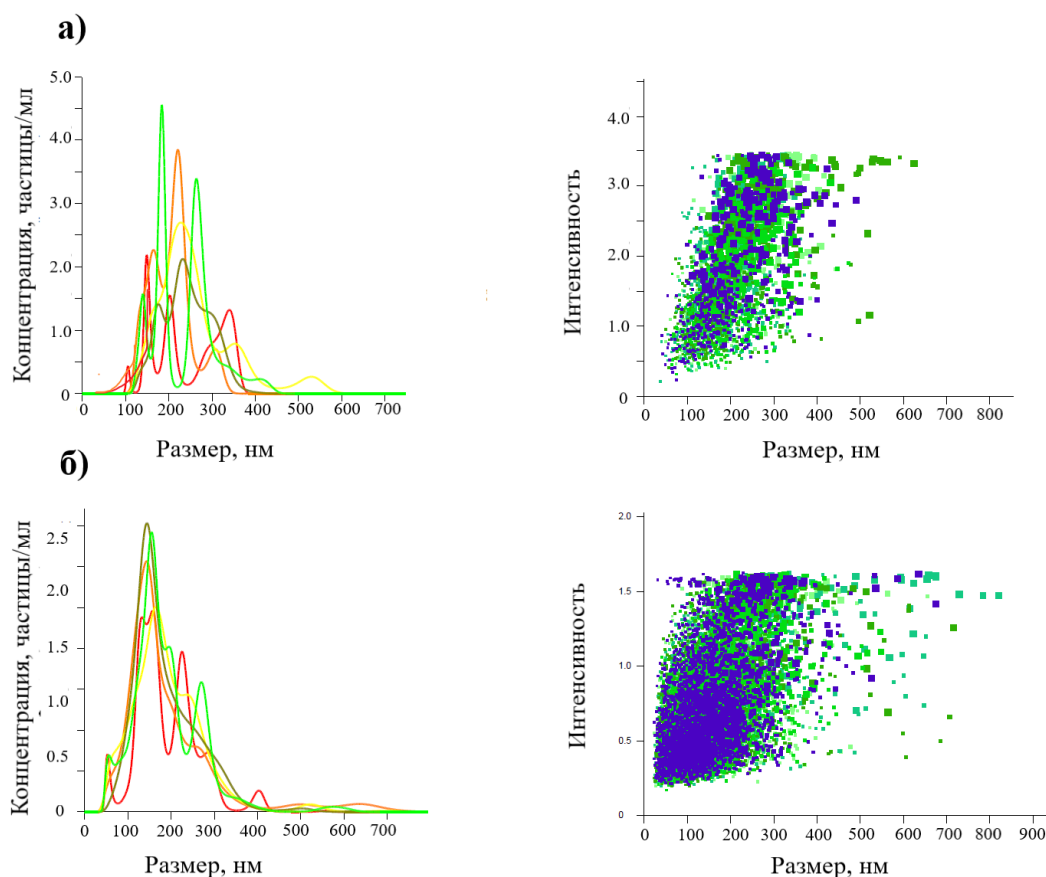


Рисунок 24. Распределение по размерам инкапсулированных частиц крупной фракции (а) и мелкой фракции (б) на основе ПЭГ-5000-б-ПМК, полученные методами АТЧ. Начальное количество диоксидэта 3 мг.

3.5. Эффективность инкапсулирования диоксидэта в частицы, полученные методом наносоаждения

Были исследованы эффективность инкапсулирования (ЭИ) и загрузка препарата (Q) на миллиграмм полимерных частиц в зависимости от природы и молекулярной массы полимера. Количественное определение загруженного препарата изучалось спектрофотометрическим методом. Из полученных данных можно сделать следующие заключения: ЭИ и количество загружаемого препарата на миллиграмм частиц растут при увеличении молекулярной массы полимера, так как при увеличении длины полимерных цепей возрастает вероятность захвата ими большего количества препарата.

На рис. 25. представлена зависимость ЭИ от природы полимерного носителя и его молекулярной массы, при исходном количестве диоксидэта 1 мг.

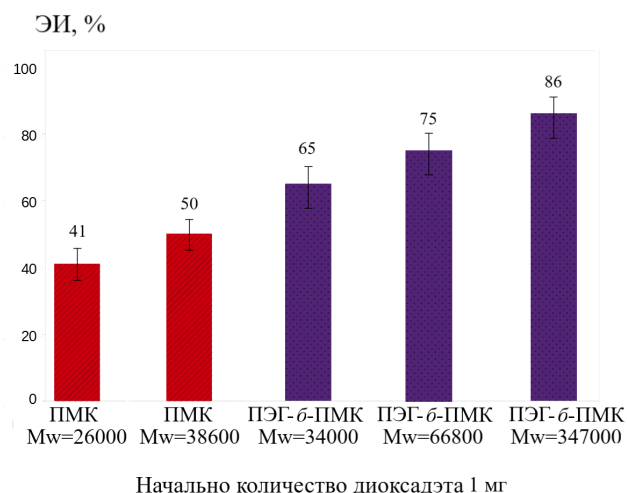
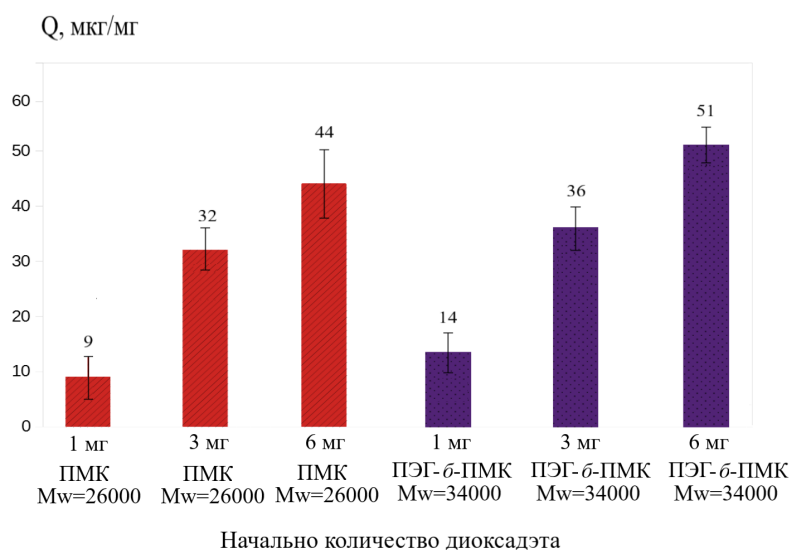


Рисунок 25. Зависимость эффективности инкапсулирования от природы и молекулярной массы полимера при начальном количестве диоксидэта 1 мг.

Из данных, представленных на рис. 25., можно сделать вывод, что ЭИ увеличивается с ростом молекулярной массы полимера от 41 % для Mw 26 000 до 86 % для Mw

347 000 при одинаковом количестве загружаемого препарата (1 мг). Причем ЭИ для частиц на основе гомополимера ниже (50%), чем для частиц на основе амфифильного блок-сополимера (65 %) при близких значениях молекулярной



массы. Рисунок 26. Зависимость загрузки диоксида от начального количества препарата.

Рост количества загружаемого препарата на миллиграмм частиц (Q) пропорционален увеличению количества загружаемого препарата. Из данных, представленных рис. 26., можно сделать вывод, что способность загрузки препарата у частиц на основе сополимера ПЭГ-5000-б-ПМК выше, чем у частиц на основе гомополимера ПМК, за счет присутствия ПЭГ, приводящего к повышению стабильности частиц.

На рис. 27. продемонстрированы зависимость ЭИ и загрузки препарата в наночастицы от природы полимера при начальном количестве загружаемого диоксида 1 и 6 мг. При увеличении количества загружаемого лекарства, эффективность инкапсулирования снижается, но растет количество загружаемого препарата на миллиграмм частиц и размеры частиц.

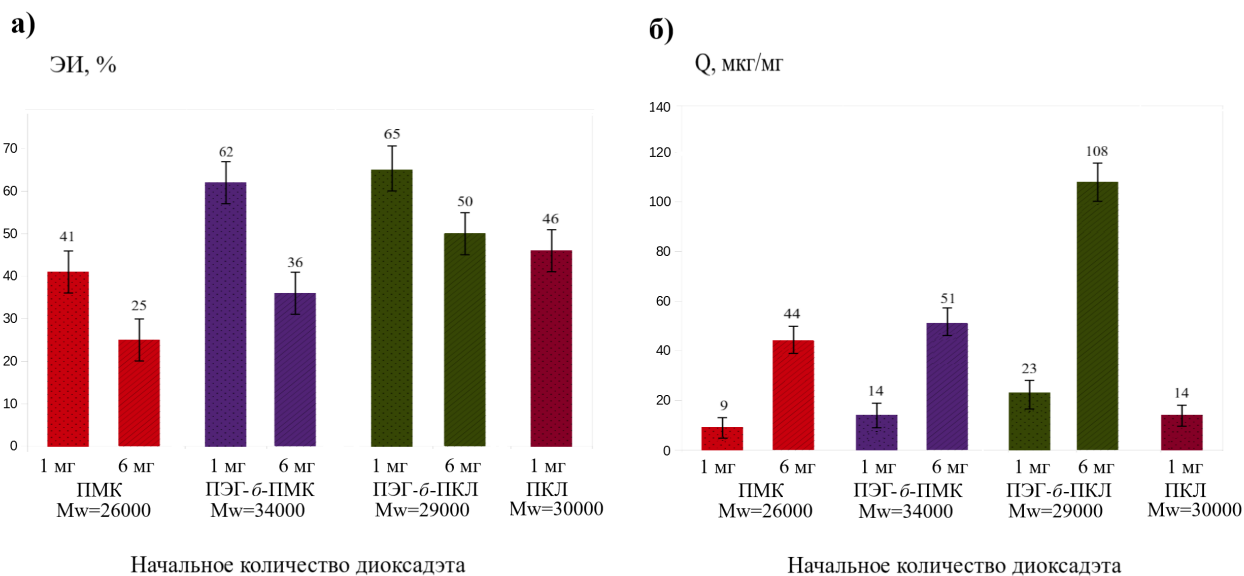


Рисунок 27. Зависимость эффективности инкапсулирования (а) и загрузки препарата (б) от природы полимера.

При сравнении эффективности инкапсулирования и общей загрузки между гомополимерами и блок-сополимерами, можно сделать вывод, что ЭИ и загрузка препарата возрастает при переходе от контейнеров на основе гомополимера ПМК к

сополимерам ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ. Это может быть связано с тем, что присутствие поли(этиленгликолевого) фрагмента дополнительно стабилизирует частицы в водной фазе и позволяет инкапсулировать больше препарата. Причем загрузка препарата увеличивается примерно в два раза при переходе от ПЭГ-5000-б-ПМК к ПЭГ-5000-б-ПКЛ (14 и 23 мкг/мг при инкапсулировании 1 мг диоксидэа и 51 и 108 мкг/мг при инкапсулировании 6 мг диоксидэа). ЭИ также повышается при переходе от ПЭГ-5000-б-ПМК к ПЭГ-5000-б-ПКЛ с 46 до 65 % при инкапсулировании 1 мг диоксидэа и 36 и 50 % при инкапсулировании 6 мг, соответственно. Высокие значения ЭИ и загрузки для контейнеров на основе поли(капролактоновых) носителей могут быть объяснены его кристаллической структурой, которая придает получаемым частицам пористость, облегчающую захват препарата.

Таким образом, более гидрофобные частицы на основе ПЭГ-5000-б-ПКЛ и ПКЛ показали лучшую способность к инкапсулированию диоксидэа, чем контейнеры из ПМК, особенно при инкапсулировании 3 и 6 мг препарата. Представленные результаты могут быть связаны с поликристаллической структурой ПКЛ, которая благодаря своей большей упорядоченности может вместить большее количество диоксидэа, по сравнению с аморфной структурой ПМК. Но из-за гидрофобных свойств ПКЛ использование сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ с молекулярной массой более 40000 для получения частиц было невозможно вследствие необратимой агрегации полимера в водной фазе в процессе наносаждения.

3.6. Эффективность инкапсулирования диоксидэа в контейнеры, полученные методом одинарной эмульсии

Эффективность инкапсулирования как крупной фракции, так и мелкой фракции частиц, полученных методом одинарной эмульсии, были проанализированы. На рис. 28.а. представлены результаты ЭИ в зависимости от природы полимера, фракции и размера частиц при начальном количестве диоксидэа, равном 1 мг. ЭИ для мелкой фракции находится в диапазоне от 44 % для ПМК до 65 % для ПЭГ-5000-б-ПКЛ. ЭИ для частиц мелкой фракции на основе гомополимера ПКЛ и амфифильных сополимеров ПЭГ-5000-б-ПМК, ПЭГ-5000-б-ПКЛ имеет близкие значения от 60 до

65 %. Такая же тенденция наблюдается и для частиц крупной фракции, имеющей значения ЭИ от 21 % для ПМК до 30 % для ПЭГ-5000-б-ПМК. ЭИ для частиц мелкой фракции выше, чем для более крупных контейнеров. Высокие значения ЭИ для ПКЛ можно объяснить его пористой полукристаллической структурой, отличающей его от частиц на основе аморфного гомополимера ПМК.

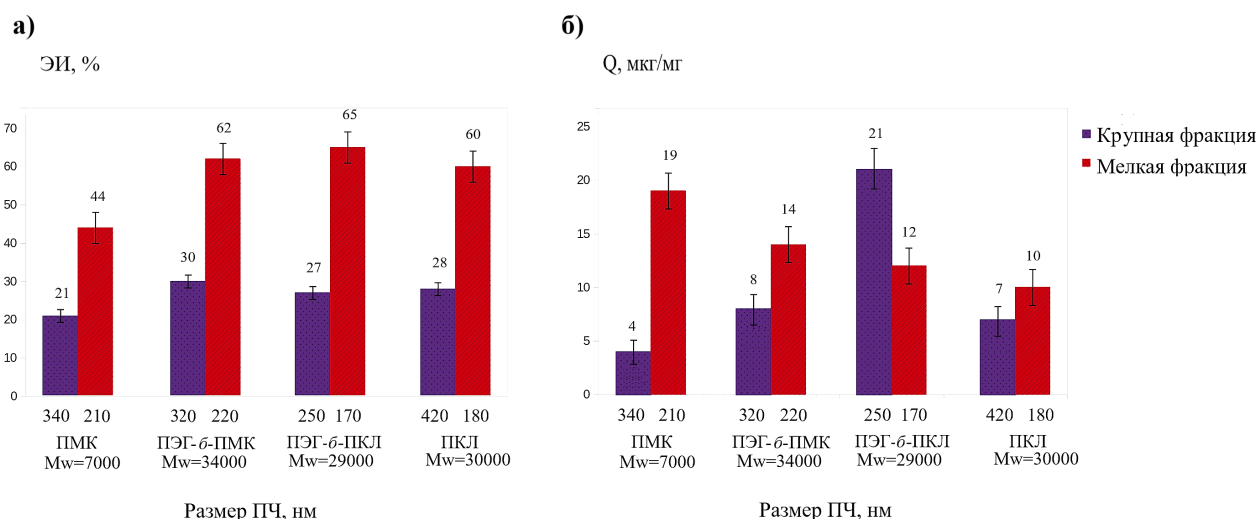


Рисунок 28. Зависимость ЭИ (а) и загрузки препарата (б) от размера и природы полимерных частиц при начальном количестве диоксидэта 1 мг.

Величина загрузки диоксидэта в частицы крупной фракции увеличиваются в ряду ПМК, ПКЛ, ПЭГ-5000-б-ПМК, ПЭГ-5000-б-ПКЛ и находится в диапазоне от 4 до 21 мкг/мг частиц (рис. 28.б.). Частицы крупной фракции (кроме частиц на основе сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ) способны загрузить меньше диоксидэта, чем частицы мелкой фракции, величины загрузки препарата в которых варьируются от 10 мкг/мг для ПКЛ до 19 мкг/мг для частиц на основе ПМК.

Далее были изучены ЭИ и загрузка диоксидэта в зависимости от метода получения частиц: одинарная эмульсия (крупная и мелкая фракции) и наноосаждение при начальном количестве диоксидэта 1 мг (рис. 29.). По сравнению с наноконтейнерами, частицы крупной фракции, сформированные методом одинарной эмульсии, имеют более низкие значения ЭИ: от 21 % для частиц на основе ПМК до 30 % для частиц из ПЭГ-5000-б-ПКЛ. Частицы из мелкой фракции, полученные методом одинарной эмульсии, способны инкапсулировать аналогичное количество диоксидэта,

что и эквивалентные им контейнеры, сформированные наноосаждением. Также можно сделать вывод, что ЭИ частиц мелкой фракции, полученных методом одинарной эмульсии, на основе ПКЛ выше, чем ЭИ контейнеров, сформированных методом наноосаждения.

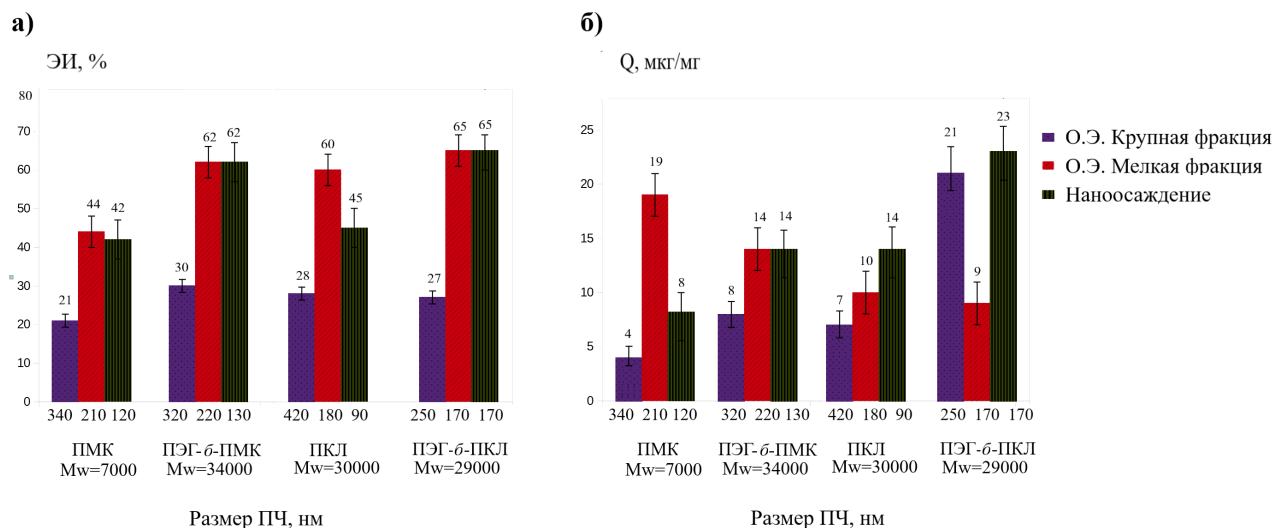


Рисунок 29. Зависимость ЭИ (а) и загрузки препарата (б) от размера, способа получения и природы полимерных частиц при начальном количестве диоксадэта 1 мг.

Сравнительный анализ данных, полученных при рассмотрении загрузки препарата для частиц из ПМК, продемонстрировал, что высокие значения загрузки диоксадэта (19 мкг/мг) имеют частицы мелкой фракции, сформированные методом одинарной эмульсии. Частицы на основе ПЭГ-5000-δ-ПМК мелкой фракции и частицы, полученные методом наноосаждения, имеют одинаковые значения загрузки - 14 мкг/мг. Для контейнеров из ПКЛ лучшие значения получены методом наноосаждения - 14 мкг/мг. В отличие от описанных ранее полимеров, частицы крупной фракции, сформированные методом одинарной эмульсии, на основе амфифильного блок-сополимера ПЭГ-5000-δ-ПКЛ имеют высокие значения загрузки - 21 мкг/мг, близкие к величинам, которые были достигнуты для контейнеров, полученных методом наноосаждения - 23 мкг/мг.

Также для всех частиц наблюдается ряд тенденций: значения загрузки диоксадэта частицами крупной фракции, полученные методом одинарной эмульсии, и контейнеров, сформированных методом наноосаждения, увеличиваются в ряду ПМК,

ПКЛ, ПЭГ-5000-*б*-ПМК и ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ. Для частиц мелкой фракции, полученных методом одинарной эмульсии, тенденция имеет противоположное направление: в ряду ПМК, ПКЛ, ПЭГ-5000-*б*-ПМК и ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ загрузка уменьшается. Таким образом, метод одинарной эмульсии позволяет загрузить больше диоксидэта частицам на основе ПМК (мелкая фракция) и ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ (крупная фракция).

Суммарная же эффективность инкапсулирования частиц, полученных методом одинарной эмульсии, больше, чем ЭИ частиц, полученных методом наноосаждения (рис. 30.а)) при начальном количестве диоксидэта 1 мг.

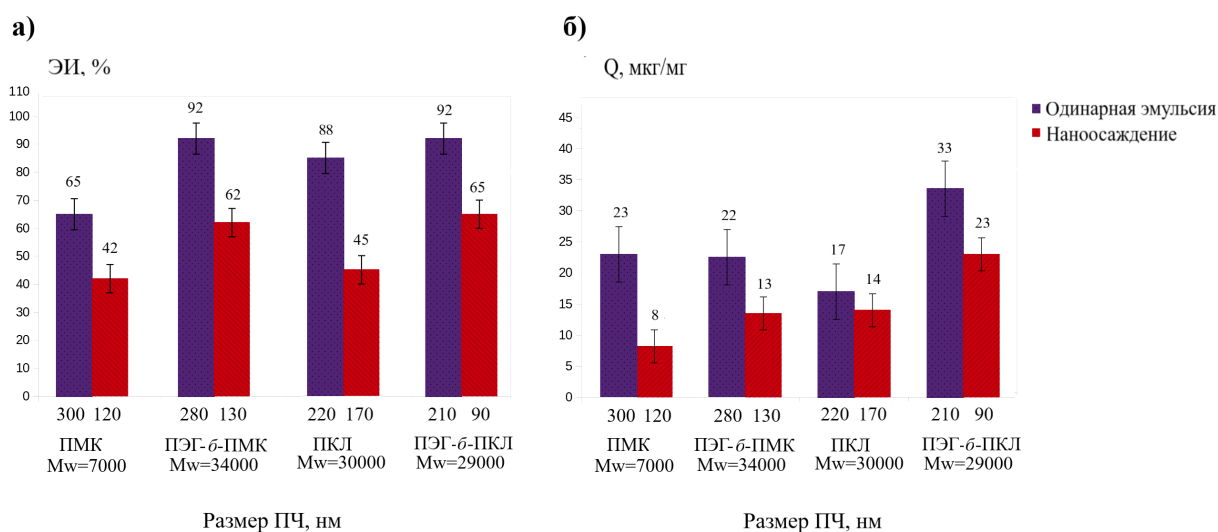


Рисунок 30. Зависимость эффективности инкапсулирования (а) и загрузки препарата (б) от метода получения полимерных частиц при начальном количестве диоксидэта 1 мг.

Таким образом, частицы наноразмеров (100-200 нм) захватывают диоксидэт лучше, чем частицы с размерами больше 300 нм. Для инкапсулирования маленьких доз препарата (1-3 мг) хорошо подходят частицы на основе блок-сополимеров поли(молочной кислоты) с поли(этиленгликолем). Дополнительная стабилизация частиц в водной фазе за счет гидрофильного блока ПЭГ позволяет загружать больше препарата и предотвращать осаждения полимера при использовании больших молекулярных масс. Для загрузки большего количества диоксидэта подходит блок-сополимер ПЭГ-5000-*б*-ПКЛ. Повышение эффективности инкапсулирования и количества загружаемого препарата по сравнению с ПЭГ-5000-*б*-ПМК может

объясняться для амфифильного сополимера ПЭГ-5000-б-ПКЛ более гидрофобной природой ПКЛ и его полукристаллической структурой, которая позволяет проникать большему количеству препарата в отличие от аморфной структуры ПМК.

Для получения частиц из ПКЛ и ПЭГ-5000-б-ПКЛ необходимо использовать полимеры с молекулярной массой менее 30000, так как из-за гидрофобных свойств полимера происходит его осаждения во время образования частиц. В то время как для получения стабильных частиц из ПЭГ-5000-б-ПМК можно использовать полимеры с молекулярной массой до 350000, что способствует повышению количества загружаемого препарата в частицы и является эффективным инструментом для регулирования скорости высвобождения лекарства в систему.

Частицы на основе гомополимеров ПМК и ПКЛ характеризовались меньшими ЭИ и загрузкой препарата, а также большими размерами частиц по сравнению с контейнерами, полученными на основе амфифильных блок-сополимеров: ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ. Для получения суспензии частиц на основе ПМК и ПКЛ нужны были полимеры с меньшими молекулярными массами, чем для аналогичных контейнеров на основе блок-сополимеров из-за низкой стабильности гидрофобных частиц в водной фазе.

Частицы, полученные методом одинарной эмульсии, с размерами более 300 нм характеризуются меньшей ЭИ, чем частицы, полученные методом наноосаждения с размерами до 250 нм. Но сам метод одинарной эмульсии позволяет получить фракции и наночастиц, и микрочастиц. Общая ЭИ и загрузка препарата у метода одинарной эмульсии выше, чем у метода наноосаждения за счет дополнительной стабилизации ПАВ.

Таким образом, различные методы получения полимерных частиц позволяют получать контейнеры в большом диапазоне размеров и загружать необходимое количество лекарственного препарата. Вариация природы полимерного носителя, его молекулярной массы и размера контейнера является эффективным инструментом для достижения желательной скорости высвобождения. В перспективе, использование комбинации частиц различной природы и разного размера может позволить дозированно высвобождать лекарственный препарат с необходимой скоростью для терапевтического эффекта в соответствующих органах.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние условий полимеризации с раскрытием цикла для получения биосовместимых амфифильных блок-сополимеров на основе поли(этиленгликоля) с молекулярной массой 5000 (ПЭГ-5000) с поли(молочной кислотой) ПЭГ-5000-б-ПМК и поликапролактоном ПЭГ-5000-б-ПКЛ, а также гомополимеров ПМК и ПКЛ на молекулярно-массовых характеристики полимерных носителей.
2. Впервые получены полимерные частицы с инкапсулированным цитостатическим препаратом – диоксадэтом на основе: ПЭГ-5000-б-ПМК, ПЭГ-5000-б-ПКЛ, а также гомополимеры ПМК и ПКЛ. Установлены тенденции формирования полимерных контейнеров, содержащих диоксадэт, полученных с использованием методов: одинарной эмульсии и наноосаждения.
3. Показано, что частицы, полученные методом наноосаждения, содержащие противоопухолевый препарат, имеют диаметр от 90 до 170 нм и характеризуются узким распределением по размерам.
4. Установлено, что контейнеры с цитостатическим препаратом, сформированные методом одинарной эмульсии, содержат частицы мелкой и крупной фракции. Диаметр полимерных контейнеров может варьироваться от 170 до 700 нм.
5. Изучена эффективность инкапсулирования и максимальная загрузка противоопухолевого препарата в полимерные частицы в зависимости от природы и молекулярно-массовых характеристик полимеров, а также от способа получения частиц.
6. Показано, что амфифильные блок-сополимеры ПЭГ-5000-б-ПМК и ПЭГ-5000-б-ПКЛ являются более перспективными носителями по сравнению с гомополимерами на основе ПМК и ПКЛ и характеризуются большими значениями эффективности инкапсулирования и загрузки лекарственного препарата. Максимальная загрузка препарата составляет 108 мкг/мг полимерных частиц, а эффективность инкапсулирования достигает 92 %.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор данной работы выражает огромную благодарность научному руководителю — к.х.н. Синицыной Екатерине Сергеевне за общее руководство и неоценимую помощь на всех этапах проведения исследования, а также коллективу Межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии СПбГУ за помощь в проведении экспериментов.

Также автор благодарит сотрудников ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Петрова» за предоставление противоопухолевого препарата диоксидэпта.

Автор выражает признательность Аверьянову Илье Валерьевичу, сотруднику Института Высокомолекулярных соединений РАН, за помощь в проведении анализов ГПХ.

Исследования проведены с использованием оборудования Межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. **2010**, 75 (1), 1–18.
2. Chevalier M.T., Gonzalez J., Alvarez V. Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*. **2015**, 49, 187–190.
3. Swider E., Koshkina O., Tel J., Cruz L.J. Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. **2018**, 73, 38–51.
4. Letchford K., Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2007**, 65 (3), 259–269.
5. Kim H., Lee J.H., Kim J.E., Kim Y.S., Ryu C.H. Micro-/nano-sized delivery systems of ginsenosides for improved systemic bioavailability. *Journal of Ginseng Research*. **2018**, 42 (3), 361–369.
6. Shalgunov V., Zaytseva-Zotova D., Zintchenko A., Levada T., Shilov Y., Andreyev D. Comprehensive study of the drug delivery properties of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol) nanoparticles in rats and tumor-bearing mice. *Journal of controlled release*. **2017**, 261, 31–42.
7. Wang Y., Zheng Y., Zhang L., Wang Q., Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of controlled release*. **2013**, 172 (3), 1126–1141.
8. Shenoy D.B., Amiji M.M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer, *International Journal of Pharmaceutics*. **2005**, 293 (1), 261–270.
9. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2002**, 54 (5), 631–651.

10. Varan C., Bilensoy E. Cationic PEGylated polycaprolactone nanoparticles carrying post-operation docetaxel for glioma treatment. *Beilstein Journal of Nanotechnol.* **2017**, 8 (1), 1446–1456.
11. Ernsting M.J., Murakami M., Roy A., Li S. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of controlled release.* **2013**, 172 (3), 782–794.
12. Freiberg S., Zhu X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics.* **2004**, 282 (1), 1–18.
13. Pagels R.F., Prud'Homme R.K. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *Journal of controlled release.* **2015**, 219, 519–535.
14. Mogi T., Ohtake N., Yoshida M., Chimura R. Sustained release of 17 β -estradiol from poly(lactide- co -glycolide) microspheres in vitro and in vivo. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2000**, 17, 153–165.
15. Matsumoto J., Nakada Y., Sakurai K., Nakamura T., Takahashi Y. Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *International Journal of Pharmaceutics.* **1999**, 185(1), 93–101.
16. Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2003**, 55 (3), 329–347.
17. Hwang Y.M., Pan C.T., Lin Y.M., Zeng S.W., Yen C.K., Wang S.Y. Preparation of biodegradable polycaprolactone microcarriers with doxorubicin hydrochloride by ultrasonic-assisted emulsification technology. *Sensors and Materials.* **2019**, 31 (1), 301–310.
18. Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science.* **2010**, 35 (10), 1217–1256.

19. Yasugi K., Nagasaki Y., Kato M., Kataoka K. Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carrier. *Journal of Controlled Release*. **1999**, 62 (1–2), 89–100.
20. Sisson A.L., Ekinici D., Lendlein A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polymer*. **2013**, 54 (17), 4333–4350.
21. Sungyeap Hong C.L. An Overview of the Synthesis and Synthetic Mechanism of Poly (Lactic acid). *Modern Chemistry & Applications*. **2014**, 2 (4), 1-5.
22. Savioli Lopes M., Jardini A.L., Maciel Filho R. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. *Procedia Enginnering*. **2012**, 42, 1402–1413.
23. Yarkova A. V, Novikov V.T., Glotova V.N., Shkarin A.A., Borovikova Y.S. Vacuum Effect on the Lactide Yield. *Procedia Chemistry*. **2015**, 15, 301–307.
24. Fishbein I., Chorny M., Rabinovich L., Banai S., Gati I., Golomb G. Nanoparticulate delivery system of a tyrphostin for the treatment of restenosis. *Journal of Controlled Release*. **2000**, 65 (1), 221–229.
25. Leroux J., Allemann E., Jaeghere F., Doelker E., Gurny R. Biodegradable nanoparticlts – From sustained release formulation to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*. **1996**, 39, 339–350.
26. Raval J.P., Naik D.R., Amin K.A., Patel P.S. Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Saudi Chemical Society*. **2014**, 18 (5), 566–573.
27. Ramanujam R., Sundaram B., Janarthanan G. Biodegradable Polycaprolactone Nanoparticles Based Drug Delivery Systems: A Short Review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. **2018**, 15 (3), 679–685.
28. Tavares M.R., Menezes L.R., Filho J.C., Cabral L.M., Tavares M.B. Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. *Polymer Testing*. **2017**, 60, 39–48.

29. Stolnik S., Illum L., Davis S.S. Long circulating microparticulate drug carriers *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, 64, 290–301.
30. Shen X., Wang Y., Xi L., Li S. Biocompatibility and paclitaxel/cisplatin dual-loading of nanotubes prepared from poly(ethylene glycol)-polylactide-poly(ethylene glycol) triblock copolymers for combination cancer therapy. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2019**, 27 (7), 1025–1035.
31. Gao H., Wang Y., Fan Y., Ma J. Synthesis of a biodegradable tadpole-shaped polymer via the coupling reaction of polylactide onto mono(6-(2-aminoethyl)amino-6-deoxy)- β -cyclodextrin and its properties as the new carrier of protein delivery system. *Journal of Controlled Release*. **2005**, 107 (1), 158–173.
32. Nidhi, Rashid M., Kaur V., Singh S., Sharma S., Mishra N. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis : A brief review, *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2016**, 4 (4), 458–472.
33. Householder K.T., DiPerna D.M., Chung E.P., Lunning A.R. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces pH driven precipitation of quisinostat onto PLA-PEG nanoparticles enables treatment of intracranial glioblastoma. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. **2018**, 166, 37–44.
34. Jafari S., Assadroop E., He Y., Bhandari B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*. **2008**, 22, 1191–1202.
35. Peng J., Dong W., Li l., Xu J., Jin D., Xia X. Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large- diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. *Journal of food and drug analysis*, **2015**, 3, 823-835.
36. Canselier J.P., Wilhelm A.M., Demas H., Gourdon C. Emulsification by ultrasound : drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*. **1999**, 6, 75–83.
37. Behrend O., Ax K., Schubert H. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2000**, 7, 77–85.
38. Lobo L., Svereika A. Coalescence during emulsification 2. Role of small molecule surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2003**, 261, 498–507.

39. Thorat A.A., Dalvi S. V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions : Recent developments and future perspective. *Chemical Engineering Journal*. **2012**, 181, 1-34.
40. Tao J., Chow S.F., Zheng Y. Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2019**, 9 (1), 4–18.
41. Kemala T., Budianto E., Soegiyono B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly (lactic acid) and poly (ε -caprolactone) with poly (vinyl alcohol) as emulsifier. *Arabian Journal of Chemistry*. **2012**, 5 (1), 103–108.
42. Astete C.E., Kumar C.S.S.R., Sabliov C.M. Size control of poly (D , L -lactide- co - glycolide) and poly (D , L -lactide- co -glycolide) -magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique. 2007. Vol. 299. P. 209–216.
43. Alex A.T. et al. Development and evaluation of carboplatin- loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. **2017**, 299, 209-216.
44. Morales-cruz M., Flores-Fernandez G., Orellano E., Rodriguez-Martinez J. Results in Pharma Sciences Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results in Pharma Sciences*. **2012**, 2, 79–85.
45. Beck-broichsitter M., Rytting E., Lebhardt T., Wang X., Kissel T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery : A shift in the “ ouzo region ” upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2010**, 41 (2), 244–253.
46. Lepeltier E., Bourgaux C., Couvreur P. Nanoprecipitation and the “ Ouzo effect ” : Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2014**, 71, 86–97.
47. Kumar V., Prud R.K. Nanoparticle stability: Processing pathways for solvent removal. *Chemical Engineering Science*. **2009**, 64, 1358–1361.

48. Saad W.S., Prud R.K. Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation *Nanotoday*. **2020**, *11* (2), 212–227.
49. Thioune O., Fessi H., Devissaguet J. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation : influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. J.. *Journal of Pharmaceutics*. **1997**, *146*, 233–238.
50. Legrand P., Lesier S., Bochot A., Gref R. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*. **2007**, *344*, 33–43.
51. Cheng J., Teply B., Sherify I., Sung J., Luther G. Formulation of functionalized PLGA – PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. **2007**, *28*, 869–876.
52. Jung T., Breitenbach A., Kissel T. Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide)s facilitate the preparation of small negatively charged biodegradable nanospheres. *Journal of Controlled Release*. **2000**. *67* (2), 157–169.
53. Bally F., Garg D., Serra C., Hoarau Y., Anton N. Improved size-tunable preparation of polymeric nanoparticles by microfluidic nanoprecipitation. *Polymer*. **2012**, *53* (22), 5045–5051.